



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI
Corso di Laurea specialistica in Neurobiologia Molecolare

**Determinazione di marcatori di
stress ossidativo prima e dopo
supplementazione orale con
donatore di cisteina addizionato con
SOD-1 in pazienti affetti da
Distrofia Miotonica tipo 1**

Candidato
Rossella Vitto

Relatore
Chiar.mo Prof. Gabriele Siciliano

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

Alla mia famiglia

INDICE

1. RIASSUNTO DELLA TESI.....	4
2. INTRODUZIONE.....	6
2.1 Lo stress ossidativo.....	7
2.1.1 <i>I radicali liberi.....</i>	<i>7</i>
2.1.2 <i>I meccanismi di generazione dei radicali liberi.....</i>	<i>11</i>
2.1.3 <i>Il sistema di difesa antiossidante.....</i>	<i>16</i>
2.1.4 <i>I Danni cellulari da radicali liberi.....</i>	<i>20</i>
2.1.5 <i>Lo stress ossidativo nelle malattie neurologiche.....</i>	<i>22</i>
2.2 La Distrofia Miotonica tipo 1.....	26
3. SCOPO DELLA TESI.....	33
4. MATERIALI E METODI.....	34
4.1 Soggetti in studio.....	34
4.2 Terapia.....	37
4.3 Protocollo di esercizio.....	38
4.4 Dosaggi biochimici.....	40
4.4.1 <i>Determinazione del glutathione totale</i>	<i>40</i>
4.4.2 <i>Determinazione della capacità ferro-riducente del plasma.....</i>	<i>41</i>
4.4.2 <i>Determinazione dei prodotti di ossidazione delle proteine.....</i>	<i>42</i>
4.5 Analisi statistica.....	43
5. RISULTATI.....	44

5.1 Prodotti di ossidazione avanzata delle proteine.....	45
5.2 Capacità ferro-riducente del plasma.....	49
5.3 Glutazione totale.....	53
 6. DISCUSSIONE.....	 57
7. CONCLUSIONI.....	63
 8. BIBLIOGRAFIA E RINGRAZIAMENTI.....	 63

1. RIASSUNTO DELLA TESI

Lo stress ossidativo è una condizione patologica causata da uno squilibrio fra la produzione delle specie chimiche reattive e l'eliminazione delle stesse da parte dei sistemi di difesa antiossidante.

Le specie reattive radicaliche sono fisiologicamente prodotte dalla cellula durante il metabolismo, ma una loro eccessiva concentrazione, dovuta ad una overproduzione e/o a un abbassamento dei livelli di sostanze antiossidanti, può essere nociva nei confronti delle cellule.

Lo stress ossidativo sembra essere coinvolto in molte malattie neurologiche come le malattie mitocondriali e le distrofie miotoniche.

Tra queste ultime la Distrofia Miotonica tipo 1 (DM-1) è una patologia multisistemica che coinvolge non solo il muscolo scheletrico, ma anche il sistema visivo, l'apparato endocrino, il sistema nervoso centrale, quello di conduzione cardiaca, il sistema riproduttivo e l'apparato gastrointestinale. La malattia è caratterizzata da miotonia e debolezza muscolare ed è trasmessa geneticamente con meccanismo autosomico dominante. L'alterazione alla base della sua manifestazione è un'anomala espansione della tripletta CTG (citosina-timina-guanina) a livello del locus 19q13.3. Nonostante non siano ancora noti i meccanismi attraverso i quali l'alterazione genetica causi la patologia, sono state avanzate diverse ipotesi ed è stato anche proposto un possibile ruolo dello stress ossidativo come effetto del meccanismo patogenetico.

Nella presente tesi sono stati studiati alcuni marker di stress ossidativo in 20 soggetti affetti da DM-1. Tredici di questi pazienti hanno assunto, per 30 giorni, un concentrato di proteine del siero del latte, ricco in contenuto di

cisteina, addizionato con superossido dismutasi 1 (SOD-1) e gli altri 8 hanno assunto, per lo stesso periodo, un farmaco placebo. Le determinazioni dei marcatori di stress ossidativo sono state effettuate prima e dopo la terapia, sia in condizioni di riposo, sia durante un test da sforzo.

Nei soggetti che hanno assunto il farmaco sono stati evidenziati dopo terapia, rispetto al basale, una riduzione significativa dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP) sia in condizioni di riposo, sia durante l'esercizio, sia dopo lo sforzo e un aumento del glutathione totale. La capacità ferro-riducente plasmatica (FRAP) non ha mostrato, nei 13 pazienti, statisticamente, un aumento significativo. Questi risultati sono stati confrontati con i pazienti trattati con il placebo, evidenziando che in quest'ultimi non è stata osservata riduzione delle proteine ossidate nè un aumento del glutathione. I valori della capacità ferro-riducente plasmatica, in questi 8 pazienti, ha presentato un aumento significativo, a differenza di ciò che è successo nei pazienti trattati con l'integratore alimentare.

Questi dati evidenziano il beneficio della terapia antiossidante sui parametri biochimici valutati, sia in condizioni di riposo sia durante l'esecuzione di un esercizio aerobico muscolare; in particolare consentono di ipotizzare lo sviluppo di un minor danno ossidativo generato in condizioni di riposo e durante l'attività muscolare aerobica ed un miglioramento delle difese antiossidanti nei pazienti DM-1 in seguito a terapia, avvalorando così l'ipotesi di un effettivo ruolo dello stress ossidativo nella malattia ed al tempo stesso come meccanismo patogenetico di danno cellulare nella DM-1. Quanto le variazioni dei marcatori biochimici siano da considerarsi significative nel rilevare un miglioramento nella storia naturale della malattia resta da essere esplorato con studi a lungo termine e su gruppi consistenti di pazienti.

2. INTRODUZIONE

2.1 Lo stress ossidativo

In tutti gli organismi viventi è possibile individuare l'esistenza di un delicato equilibrio fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti (Halliwell et al., 1989). Le specie chimiche reattive sono agenti di varia natura, radicalica e non radicalica, accomunati dalla capacità di ossidare, cioè di sottrarre uno o più equivalenti riducenti ad un gran numero di atomi o molecole organiche (Malatesta et al., 1986). La generazione di queste sostanze ossidanti può dipendere dall'esposizione ad agenti esogeni come le radiazioni ionizzanti, gli xenobiotici, i farmaci, i batteri, ma può anche essere l'espressione dell'attività metabolica cellulare come l'attivazione di specifiche reazioni chimiche, enzimatiche o non enzimatiche (Gardes-Albert, 2006).

Il livello e l'attività dei sistemi di difesa antiossidante, che comprendono agenti endogeni (enzimi ad azione antiossidante, quali superossido dismutasi, catalasi e perossidasi) ed agenti esogeni (vitamine e sostanze simil-vitaminiche, quali i polifenoli vegetali), dipendono sia dal patrimonio genetico individuale che da fattori ambientali, principalmente lo stile di vita (Valko et al., 2006).

Un aumento della produzione di specie chimiche ossidanti e/o una riduzione di efficacia dei sistemi di difesa antiossidante possono condurre ad un'alterazione del bilancio ossidativo generando così una condizione nota come "stress ossidativo" (Delattre et al., 2006).

2.1.1 I radicali liberi

I radicali liberi sono atomi o raggruppamenti di atomi particolarmente instabili in quanto possiedono, in uno degli orbitali esterni uno o più elettroni spaiati. Per ritrovare il loro equilibrio chimico tendono ad appropriarsi di un elettrone di altre molecole con le quali vengono a contatto, specialmente se queste presentano elettroni “disponibili”, come quelli impiegati nei doppi legami C-C. Queste molecole, diventando instabili, a loro volta ricercano un elettrone e così via, innescando un meccanismo di instabilità a “catena”.

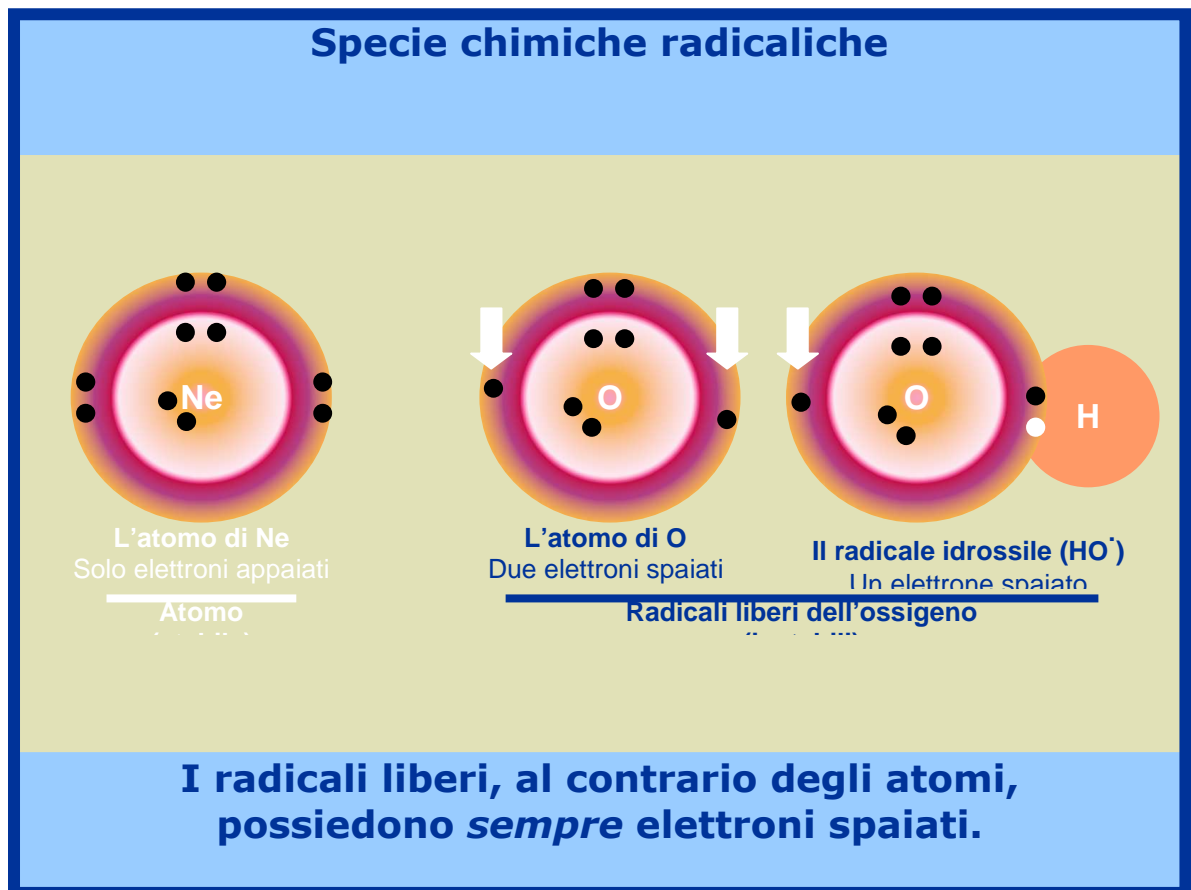


Fig 1: Esempio di radicali liberi (tratta da “Stress Ossidativo, Radicali Liberi e Antiossidanti. Aspetti nutrizionali, clinicofarmacologici e diagnostici”. Corso teorico pratico di aggiornamento. 25 Ottobre 2008, Pisa).

Le specie reattive dell'ossigeno possono così ossidare acidi nucleici, lipidi, zuccheri e proteine, causare un danno nucleare, mitocondriale, proteosomico e stress del reticolo endoplasmatico (Shibata e Kobayashi, 2008).

Le specie chimiche di maggiore interesse biologico sono quelle centrate sull'ossigeno (anione superossido, radicale idrossile, ossigeno singoletto, ecc), sull'azoto (diossido di azoto, ossido nitrico, ecc.), sul carbonio (radicali alchilici, ecc), sul cloro (acido ipocloroso) e sullo zolfo (radicale tiilico).

In ognuna di queste classi, è possibile individuare due sottoclassi, le specie chimiche reattive radicaliche e non, sulla base, rispettivamente, della presenza o meno nella loro compagine, di elettroni “spaiati”, ossia disposti singolarmente nei rispettivi orbitali. Per esempio l'ozono, il perossido di idrogeno, e l'idroperossido sono specie non radicaliche, invece il radicale ossidrile, l'anione superossido e l'ossigeno singoletto sono specie chimiche reattive radicaliche (Iorio, 2006).

SPECIE CHIMICA RADICALICA	FORMULA	SPECIE CHIMICA NON RADICALICA	FORMULA
Anione superossido	$O_2^{\bullet -}$	Ozono	O_3
Ossigeno singoletto	$^1O_2^*$	Perossido di idrogeno	H_2O_2
Idrossile	HO^{\bullet}	Acido ipocloroso	$HClO$
Alcossile	RO^{\bullet}	Acido nitroso	HNO_2
Ossido nitrico	NO^{\bullet}	Alchilidroperossido	$ROOH$

Tab. 1: Alcune specie chimiche reattive radicaliche e non radicaliche.

In funzione della distribuzione della carica e/o del proprio potenziale di ossidoriduzione, i radicali liberi presentano una reattività più o meno spiccata, legata alla tendenza spontanea ad esistere come entità aventi tutti gli elettroni

disposti in coppie, condizione che corrisponde alla stabilità o inerzia chimica (Tannini, 1990). Le specie chimiche reattive agiscono da agenti ossidanti; infatti, per la loro intrinseca natura tendono a sottrarre uno o più equivalenti riducenti ad un gran numero di atomi o molecole con cui giungono a contatto (Malatesta et al., 1986).

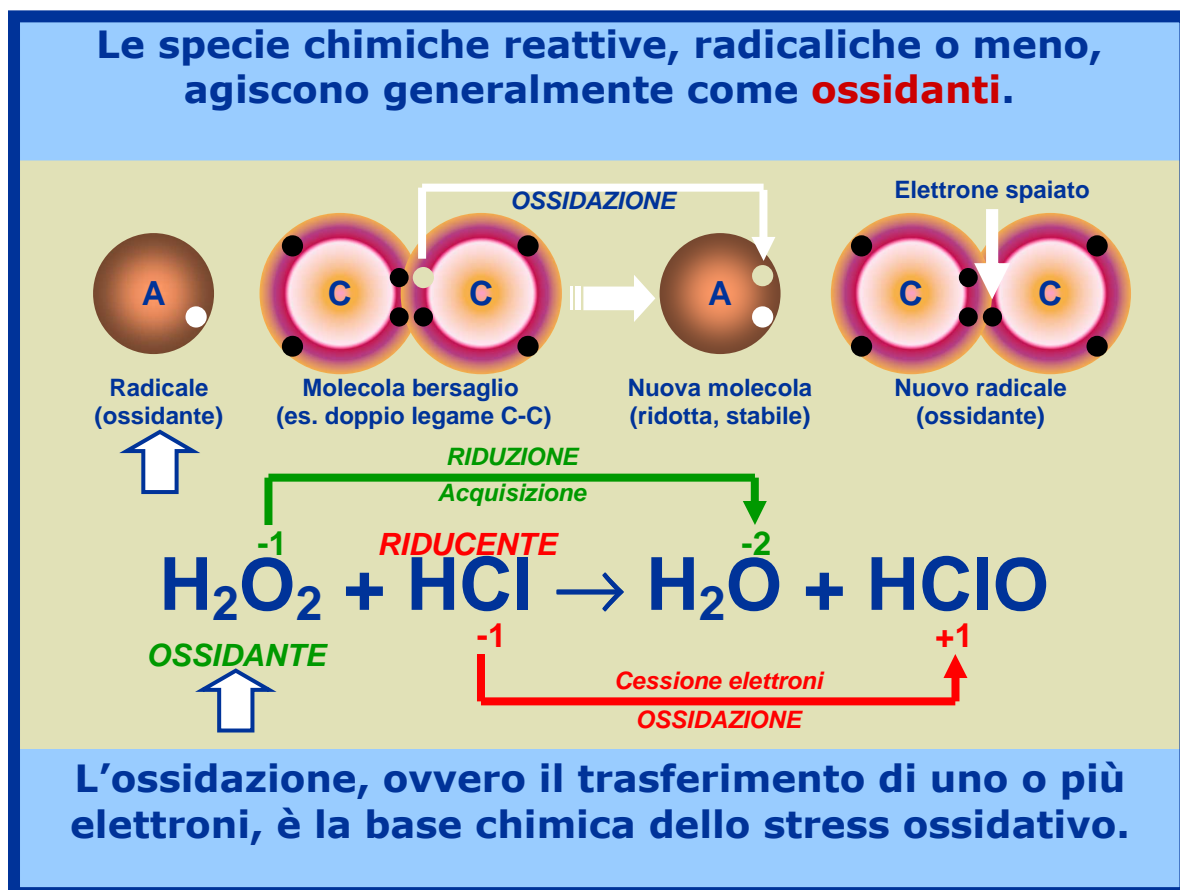


Fig 2: Basi chimiche dell'ossidazione (tratta da "Stress Ossidativo, Radicali Liberi e Antiossidanti. Aspetti nutrizionali, clinicofarmacologici e diagnostici". Corso teorico pratico di aggiornamento. 25 Ottobre 2008, Pisa).

I radicali liberi giocano un ruolo determinante negli organismi viventi, in quanto costituiscono gli intermedi obbligati delle reazioni che presiedono ai più importanti processi vitali, quali la trasformazione dell'energia potenziale contenuta nei nutrienti in energia chimica di legame, la difesa dall'attacco di germi patogeni, la detossificazione da xenobiotici e farmaci, la trasduzione di

segnali, ecc. (Ignarro, 1998). Da un punto di vista biologico risultano essere molto importanti sia le specie radicaliche o reattive dell'ossigeno (ROS) ma anche dell'azoto (RNS). Tra queste ultime ricordiamo l'ossido nitrico, indispensabile per la vita in quanto interviene direttamente nel mantenimento dell'omeostasi cellulare tramite la modulazione dell'espressione di alcuni geni e che gioca un ruolo determinante nella difesa dalle infezioni batteriche e nella prevenzione dei tumori (Wink et al., 1993).

Quindi le specie chimiche reattive sono prodotte fisiologicamente nell'organismo, ma la loro sovrapproduzione è dannosa per le cellule. Dal momento che i radicali sono continuamente prodotti in numerosi processi cellulari, gli organismi hanno evoluto sistemi di difesa antiossidante enzimatici e non enzimatici creando un equilibrio tra produzione e eliminazione di specie reattive.

2.1.2 I meccanismi di generazione dei radicali liberi

I radicali liberi possono essere generati attraverso due meccanismi generali, non enzimatici ed enzimatici.

Come abbiamo già precisato negli organismi viventi le specie chimiche reattive e, in particolare, le ROS sono generate nel corso della normale attività metabolica cellulare; alcuni agenti esogeni, tuttavia, possono incrementarne la produzione, anche con meccanismo diretto (Pryor, 1973).

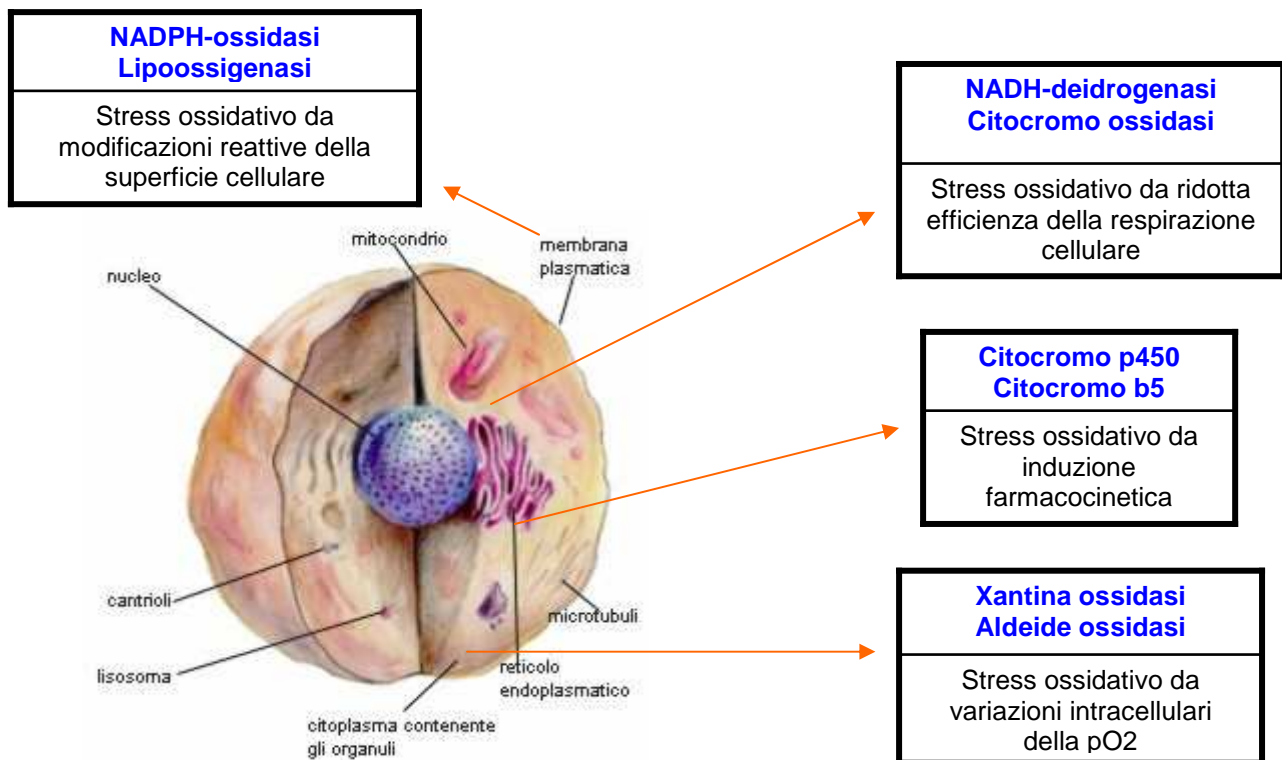


Fig 3: Differenti fonti cellulari di ROS responsabili dei diversi meccanismi di stress ossidativo (tratta da www.iprase.tn.it/natura/atlante/CELLULA/Cell_11.htm).

Nella cellula è possibile individuare almeno 5 fonti metaboliche primarie di radicali liberi: i mitocondri, la membrana plasmatica, il reticolo endoplasmatico liscio e il citosol. In ciascuna di queste sedi i ROS sono prodotti spontaneamente o grazie all'azione di enzimi o di metalli di transizione.

I mitocondri rappresentano la fonte metabolica primaria di ROS perché sulle loro creste sono localizzati i complessi enzimatici della catena respiratoria deputati alla fosforilazione ossidativa (Karlsson, 1997). Il processo genera la fosforilazione di molecole di ADP in ATP attraverso la conversione di NADH e FADH₂ nelle forme ossidate, con rilascio di elettroni.

L'ossigeno è l'accettore finale degli elettroni, li riceve dalla citocromo C ossidasi, l'ultimo enzima della catena respiratoria mitocondriale. Dalla riduzione dell'ossigeno e dagli ioni H⁺ che si formano dopo il trasferimento degli elettroni dal NADH e dal FADH₂, derivano molecole di acqua che si aggiungono a quelle prodotte con il ciclo di Crebs.

Più del 90% dell'ossigeno che noi respiriamo subisce questa riduzione tetravalente per produrre acqua. Tale processo è relativamente sicuro, per cui una certa quota di elettroni (1-2 %) sfugge al sistema di trasporto dei vari coenzimi e si ha una riduzione monovalente o bivalente dell'ossigeno molecolare producendo intermedi reattivi, rispettivamente l'anione superossido e il perossido di idrogeno (Comhair et al., 2002).

Si ritiene comunemente che la generazione mitocondriale di anione superossido rappresenti la maggior fonte intracellulare di radicali dell'ossigeno in condizioni fisiologiche. Questa produzione di ROS nel corso della fosforilazione ossidativa è una modalità non enzimatica di produzione di radicali (Karlsson, 1997).

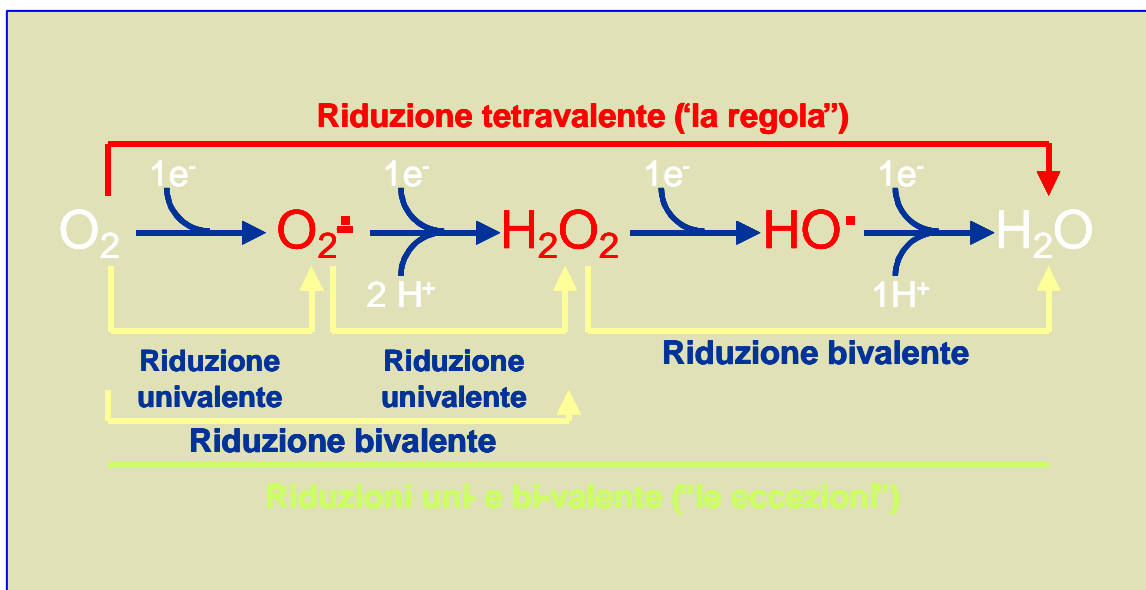


Fig 4: Riduzione monovalente e bivalente dell'ossigeno molecolare (tratta da "Stress Ossidativo, Radicali Liberi e Antiossidanti. Aspetti nutrizionali, clinicofarmacologici e diagnostici" Corso teorico pratico di aggiornamento. 25 Ottobre 2008, Pisa).

Soprattutto nei leucociti polimorfonucleati, la membrana plasmatica è un'altra importante fonte di ROS, in quanto possiede diversi enzimi, quali la NADPH-ossidasi e le lipossigenasi, la cui attivazione si accompagna alla produzione, rispettivamente di anione superossido e di intermedi metabolici con caratteristiche chimiche di perossidi (Poli, 1990). La NADPH ossidasi catalizza la formazione di anione superossido da NADPH(H⁺) ed ossigeno molecolare, in seguito alla stimolazione da parte di endotossine, batteri, o anticorpi, quindi nel corso di infezioni o infiammazioni (Iorio, 2006).

Nel reticolo endoplasmatico la produzione di specie reattive passa attraverso il citocromo p450. Quest'ultimo gioca un ruolo di primo piano nei processi di detossificazione (Knecht et al., 1992).

Una produzione di radicali liberi avviene anche nel citosol nel corso di numerose altre reazioni biochimiche, come ad esempio durante l'ossidazione dell'ipoxantina a xantina e della xantina ad acido urico, che contrassegnano la

fase finale del catabolismo dei nucleotidi purinici (Poli, 1990). Entrambe le reazioni sono catalizzate dalla xantina deidrogenasi. In particolari condizioni, come nel corso del cosiddetto danno da ischemia-riperfusion, la xantina deidrogenasi è convertita in xantina ossidasi. Tale conversione è legata all'attivazione di specifiche proteasi, indotta dall'incremento del calcio libero all'interno della cellula, una delle conseguenze del danno ossidativo da radicali liberi (Poli, 1990). La xantina ossidasi utilizza come accettore finale di elettroni direttamente l'ossigeno, generando così perossido di idrogeno ed anione superossido, a partire, rispettivamente, dall'ipoxantina e dalla xantina. Le reazioni non enzimatiche più importanti sotto il profilo biologico per la produzione di radicali liberi sono quelle catalizzate da metalli di transizione (Halliwell et al, 1986). In queste reazioni, che richiedono generalmente ferro o rame allo stato ridotto, il perossido di idrogeno è scisso in radicale idrossile e ione ossidrile per inglobamento dell'elettrone strappato al metallo di transizione, che viene rilasciato in forma ossidata (reazione di Fenton):



Il perossido di idrogeno può derivare per riduzione bivalente dell'ossigeno molecolare sfuggito alla riduzione tetravalente nella fosforilazione ossidativa, mentre i metalli di transizione possono essere liberi nella cellula, in quantità eccessiva soprattutto in condizioni patologiche (Halliwell et al., 1990).

Gli enzimi che rigenerano metalli di transizione allo stato ridotto e quindi proteggono dallo stress ossidativo comprendono la NADPH e la NADH ossidasi, l'acido nicotinico idrossilasi, il sistema del citocromo P450, la NADH reduttasi la succinico-reduttasi ecc.

Tra gli agenti esogeni in grado di generare specie reattive ricordiamo le radiazioni ionizzanti e i raggi UV, con reazioni di radiolisi o fotolisi, alcuni

farmaci, attraverso l'attivazione del citocromo P450, e i batteri e gli anticorpi, innescano rispettivamente meccanismi di difesa dalle infezioni e reazioni immunopatogene.

2.1.3 Il sistema di difesa antiossidante

Dal momento che le ROS sono continuamente prodotte in numerosi processi cellulari, gli organismi hanno evoluto un sistema di difesa antiossidante costituito sia da componenti enzimatiche che da molecole non enzimatiche.

Il sistema di difesa antiossidante è ubiquitariamente distribuito nell'organismo, sia a livello extracellulare che intracellulare.

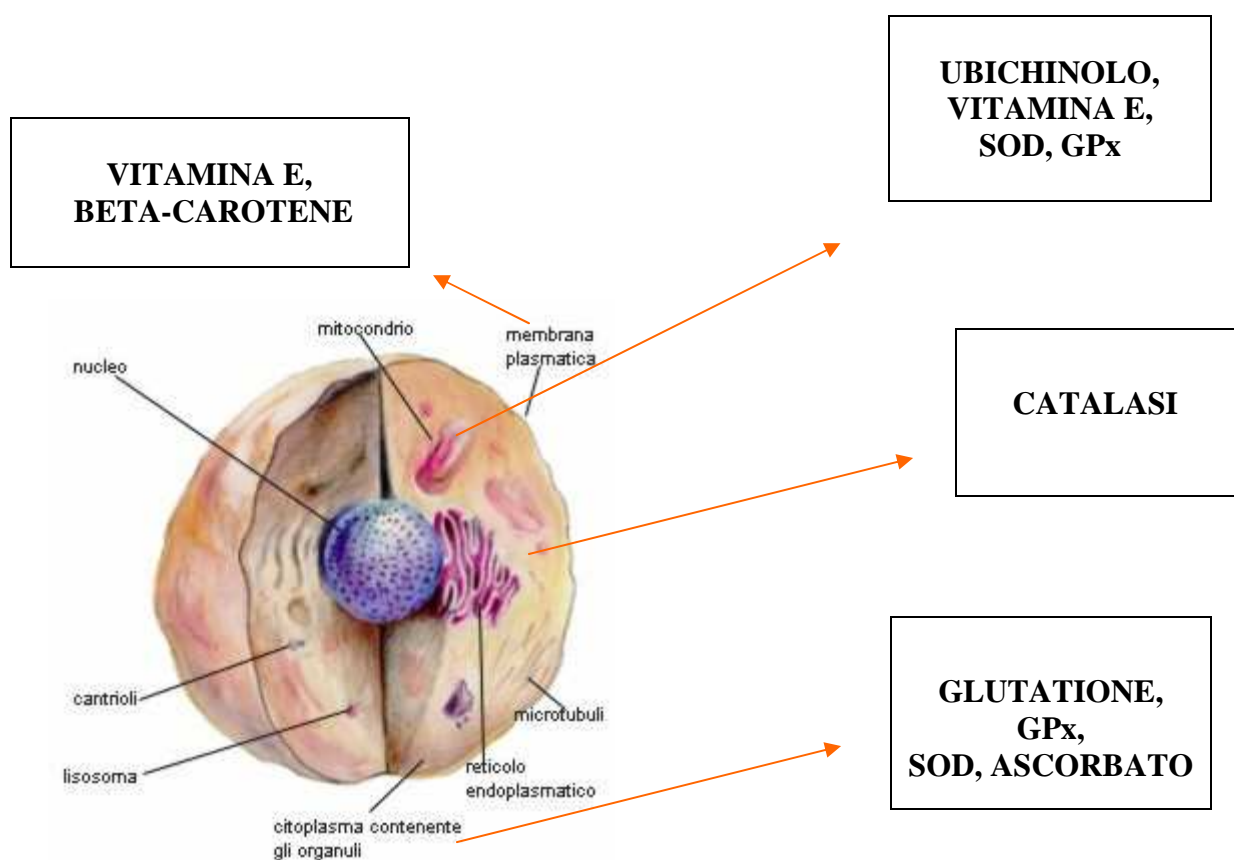


Fig 5: Compartimentazione dei sistemi antiossidanti (tratta da www.iprase.tn.it/natura/atlante/CELLULA/Cell_11.htm).

Nel plasma ritroviamo vari antiossidanti esogeni introdotti con la diete e diverse proteine come l'albumina, la bilirubina, la vitamina A, la vitamina E, l'acido ascorbico e l'acido urico.

All'interno delle cellule invece ogni antiossidante ha una sua precisa localizzazione. Gli antiossidanti sono enzimi, vitamine, sostanze

similvitaminiche e oligoelementi in grado di annullare l'azione delle specie chimiche reattive (Maxwel et al., 1995). Sulla base del loro meccanismo di azione possono essere classificati in antiossidanti preventivi, *scavenger* e *chain breaker*, agenti di riparazione e agenti di adattamento (Iorio, 2006).

Gli antiossidanti preventivi possono inattivare i radicali liberi chelando dei metalli di transizione e non permettendo la formazione di idroperossidi e perossidi. Si tratta di proteine che legano ferro e rame, presenti nella cellula perché necessari alla sintesi e alla modulazione di enzimi. Esempi di queste proteine antiossidanti sono la transferrina plasmatica e la ferritina cellulare che legano il ferro e la ceruloplasmina che chela specificatamente il rame circolante. Dall'azione di queste dipende la prevenzione del danno all'endotelio e il processo di perossidazione di componenti plasmatiche come le lipoproteine. Altri tipi di antiossidanti preventivi sono in grado di inattivare l'ossigeno singoletto, una ROS molto reattiva che si forma dall'ossigeno molecolare che sfugge alla riduzione tetravalente nella fosforilazione ossidativa. Tra questi i carotenoidi e la superossido dismutasi (SOD), un enzima di cui si conoscono tre isoforme: la Cu-Zn-SOD intracellulare (SOD-1), la Mn-SOD mitocondriale (SOD-2) e la superossido dismutasi extracellulare (SOD-3) (Marklund et al, 1982). La SOD catalizza la dismutazione di due molecole di anione superossido in una molecola di perossido d'idrogeno ed una di ossigeno.



Come abbiamo precedentemente spiegato, in presenza di metalli di transizione anche il perossido d'idrogeno può dare origine a radicali molto reattivi; questo succede quando la quantità di perossido d'idrogeno aumenta a dismisura all'interno della cellula. Gli antiossidanti preventivi inattivatori dei

perossidi sono le perossidasi. Questi enzimi evitano che gli idroperossidi e il perossido di idrogeno possano reagire con i metalli di transizione (Splittgerber, 1979). La catalasi (CAT) si trova nella cellula nei perissosomi e inattiva due molecole di perossido di idrogeno producendo due molecole di acqua e una di ossigeno molecolare. La CAT e la SOD lavorano in modo sequenziale; infatti la CAT viene attivata da alte concentrazioni di perossido di idrogeno, prodotto, a sua volta, dalla SOD.

Le perossidasi che presentano come cofattore il glutathione (GSH) sono le glutathione-perossidasi (GSHPx o GPx). La GPx può rimuovere molecole di idroperossidi lipidici derivati dai processi di lipoperossidazione. Il glutathione abbonda nella maggior parte delle cellule e, grazie al suo gruppo tiolico libero, rappresenta il principale meccanismo protettivo contro lo stress ossidativo. E' un tripeptide composto da acido glutammico, cisteina e glicina è coinvolto in diversi meccanismi del metabolismo cellulare. Caratteristica peculiare del GSH è infatti quella di possedere un legame γ -glutamilico in luogo di un normale legame peptidico tra i residui di cisteina ed acido glutammico, cosa che rende il GSH resistente alle peptidasi intracellulari e permette alle cellule di conservare in questa forma la cisteina, altrimenti tossica anche a basse concentrazioni (Paolicchi et al., 2002). Il GSH espleta la sua funzione riducendo i radicali liberi e convertendosi in glutathione ossidato (GSSG), composto da due molecole di glutathione unite da un ponte disolfuro. La sintesi del GSH dipende dalla disponibilità di cisteina ed è catalizzata dalla gamma-glutamylcisteina sintetasi e dalla GSH sintetasi.

In condizioni ideali, la SOD, la CAT e la GPx agiscono in maniera ordinata e sequenziale potenziandosi nel loro importante ruolo di antiossidanti.

Gli *scavenger* agiscono direttamente con i radicali liberi inattivandoli (Diplock, 1994). L'ubichinone, o coenzima Q, è una sostanza liposolubile presente in tutti i sistemi di accoppiamento di energia legati alle membrane. I

tioli possono inattivare i radicali alcossilici e il radicale idrossilico grazie al loro gruppo sulfidrilico (SH). I *chain breaker* invece, sono agenti in grado di bloccare la propagazione delle reazioni radicaliche a catena. Comprendono sostanze liposolubili come i carotenoidi e idrosolubili come la vitamina C (Swanso et al., 1996).

Gli agenti di riparazione sono enzimi che intervengono dopo che il danno dei radicali liberi si è instaurato (Iorio, 2006). Tra questi enzimi ricordiamo le idrolasi, le trasferasi e le polimerasi.

Per agenti di adattamento si intendono le sostanze e le tecniche che è possibile utilizzare per potenziare il sistema di difesa antiossidante, quindi comprendono un regime alimentare adeguato e una corretta attività fisica.

2.1.4 I danni cellulari da radicali liberi

Interagendo con proteine, lipidi di membrana e con il DNA, l'eccesso di ROS può generare una serie di reazioni a catena letali per la sopravvivenza della cellula.

Il danno ossidativo dei lipidi di membrana compromette la funzionalità della membrana plasmatica, con conseguente alterazione della fluidità e dell'afflusso di ioni calcio, che possono innescare la via della morte cellulare (Siciliano et al., 2002). La compromissione della struttura della membrana plasmatica è dovuta alla formazione di lipidi perossidati. I radicali liberi, soprattutto il radicale idrossile, attaccano generalmente gli acidi grassi polinsaturi con due o più doppi legami carbonio-carbonio, come l'acido arachidonico. L'estrazione di un atomo di idrogeno da parte dei radicali liberi, genera un radicale lipidico e un radicale idrogeno nelle membrane. Questo radicale lipidico, reagendo con l'ossigeno, forma radicali lipoperossidi che possono strappare atomi di idrogeno a catene di acidi grassi adiacenti. Con l'estrazione di una singola molecola di idrogeno si può attivare una reazione a catena che favorisce la conversione di molti lipidi di membrana a lipo-idroperossidi (Halliwell e Chirico, 1993).

Il DNA è attaccato soprattutto dai radicali idrossile e perossinitrito (ONOO^-) che danneggiano facilmente i siti ricchi di elettroni (Reiter et al., 1999). I danni possibili al DNA comprendono modificazione delle basi puriniche e pirimidiniche, rotture a singolo o doppio filamento, scambi tra cromatidi fratelli e formazione di micronuclei (Loft e Poulsen, 1996). Il danno alle basi puriniche si manifesta sottoforma di metilazione, deaminazione e soprattutto ossidazione. In condizioni di stress ossidativo, l'idrossilazione della guanina

in posizione C8 è una delle più frequenti modificazioni delle basi del DNA (8-idrossiguanina).

Tra le proteine che risentono maggiormente dell'attacco dei radicali liberi si annoverano la tiroglobulina, l'albumina e la mioglobulina.

I radicali liberi agiscono sulle proteine attaccando i residui aminoacidici. Particolarmente suscettibili di questo attacco sono gli aminoacidi aromatici (triptofano, tiroxina, fenilalanina) che contengono legami insaturi (Kleinveld et al., 1989) e aminoacidi come cisteina e cistina che contengono legami disolfuro e gruppi sulfridrilici. L'attacco dei radicali liberi alle proteine può portare alla formazione di carbonilproteine, le quali possono essere indice di danno ossidativo dei tessuti (Dean et al., 1997), e della 3-nitrotirosina, prodotta dal perossinitrito (Beal, 2002). L'azione dannosa dei perossidi ($\text{ROO}\bullet$) può interessare sia le proteine di membrana (Halliwell, 1992), sia le proteine mitocondriali come l'azonitasi e l'adenina nucleotide traslocasi (Yan, 1998).

2.1.5 Lo stress ossidativo nelle malattie neurologiche

Numerosi studi dimostrano come lo stress ossidativo possa influenzare, spesso in modo significativo, l'esordio e il decorso di un gran numero di patologie, tra le quali rivestono un ruolo importante le malattie neurodegenerative e le malattie neurologiche periferiche.

Le malattie neurodegenerative sono un gruppo eterogeneo di patologie che comprendono forme sporadiche e familiari e che colpiscono specifiche aree del sistema nervoso centrale. Esse conducono al graduale e progressivo deterioramento di diverse funzioni neurologiche, a seconda del tipo di neuroni coinvolti (Coppedè et al., 2006). Ci sono numerose evidenze che indicano che molte malattie neurodegenerative possono essere causate da difetti genetici dei sistemi di difesa antiossidante. Un importante esempio è la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) di origine familiare causata dalla mutazione dell'enzima SOD-1.

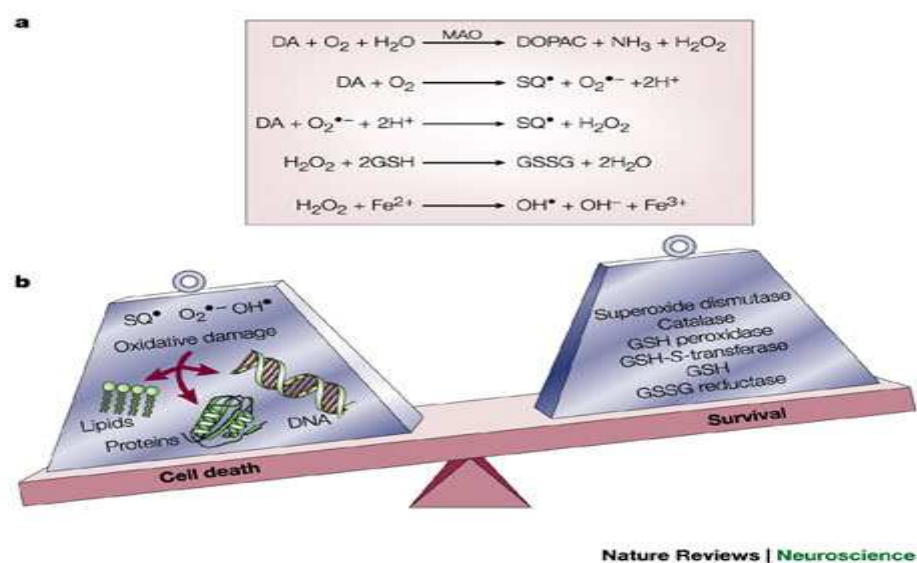


Fig. 6: Stress ossidativo.

Anche in malattie neurologiche periferiche, quali la Distrofia Miotonica di Steinert e le Miopatie Mitocondriali, è stato riscontrato un aumento dello stress ossidativo, probabilmente dovuto a fenomeni di “iperlavoro” muscolare in condizioni strutturali e/o metaboliche sub-ottimali. Recenti studi dimostrano come nel sangue di pazienti affetti da Distrofia Miotonia tipo 1 ci sia un aumento dei prodotti di ossidazione delle proteine (Siciliano et al., 2005).

Non v'è dubbio che l'asse cerebro-spinale è per definizione una struttura anatomica altamente suscettibile all'attacco delle specie chimiche ossidanti. Il solo encefalo, infatti, pur rappresentando il 2% del peso dell'intero organismo, utilizza circa il 20 % dell'ossigeno respirato, il quale costituisce l'elemento essenziale per la formazione delle ROS. L'estrema suscettibilità del sistema nervoso centrale al danno da radicali liberi (Evans, 1993) è da attribuire a diverse ragioni di ordine biochimico, fisiologico e anatomico.

In primo luogo ci sono motivi di carattere biochimico, in quanto nel sistema nervoso centrale sono presenti dei ridotti livelli di enzimi protettivi come la glutatione perossidasi (GPX) e la catalasi, e un'elevata concentrazione di substrati facilmente ossidabili. Le membrane dei neuroni sono particolarmente ricche, nella frazione fosfolipidica, di acidi grassi poliinsaturi, i cui doppi legami sono target elettivo dell'attacco di specie chimiche ossidanti (Mancuso et al., 2005).

Tra le ragioni di carattere fisiologico ricordiamo la grande quantità di ROS che viene prodotta durante le reazioni neurochimiche. I motivi anatomici che rendono il sistema nervoso centrale molto suscettibile al danno radicalico riguardano la lunghezza degli assoni, che li espone ai danni cellulari chimicamente mediati, e alla presenza di cellule neuronali perenni, ossia incapaci di entrare in mitosi e di sostituire gli eventuali elementi che sono andati perduti.

Lo stress ossidativo sembra essere causa e/o conseguenza dei processi patologici che stanno alla base delle malattie neurodegenerative e dell'invecchiamento. Dal punto di vista molecolare, l'aumento di stress ossidativo associato all'età può essere ricondotto a tre diversi fattori: un aumento della velocità di produzione dei metaboliti reattivi dell'ossigeno, un declino dei sistemi antiossidanti e una diminuita efficienza nel degradare e riparare le molecole danneggiate. Altri studi hanno suggerito che possono contribuire difetti nel metabolismo energetico e fenomeni di eccitotossicità. Basti pensare che un difetto nel metabolismo energetico causato dall'azione di alcuni radicali può portare a depolarizzazione neuronale, rilascio di glutammato, attivazione di recettori eccitatori e accumulo intracellulare di calcio, questo a sua volta stimola la produzione di altri radicali liberi creando così un circolo che si autosostiene e produce degenerazione (Govoni et al., 2001).

Un consistente numero di dati di letteratura mostra che i ROS e i RNS prodotti da disfunzione mitocondriale, da neuroinfiammazione e da sostanze tossiche sono le maggiori cause di morte cellulare in varie malattie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (Linseman, 2008).

In seguito a queste intense ricerche si è introdotto in terapia l'utilizzo di alcune sostanze antiossidanti. Tra le sostanze vitaminiche si utilizzano vitamina E e suoi analoghi, e vitamina C: tutte queste sono in grado di determinare una riduzione dei livelli medi dei radicali antiossidanti dell'ossigeno ed un aumento delle difese antiossidanti. Tra le sostanze non vitaminiche utilizzate esistono anche il coenzima Q, che sembra avere un effetto di stabilizzazione delle membrane cellulari oltre a svolgere il ruolo di potente antiossidante; a questo si aggiungono composti fenolici e polifenolici, come i flavonoidi, che hanno una potente attività anti-ossidante e riducono la

mortalità cardiovascolare (Zaidi et al., 2005). Oltre a queste si utilizza anche l'N-acetil-cisteina, un precursore del glutathione, il più importante antiossidante intracellulare. Poiché la sintesi del glutathione all'interno dei neuroni è limitata dalla disponibilità della cisteina, alcuni composti, che vengono metabolizzati a cisteina dall'organismo umano, possono essere utilizzati come pro-farmaci in grado di aumentare la concentrazione del glutathione all'interno dei neuroni. Tra questi pro-farmaci si annovera per l'appunto l'N-acetil-cisteina con o senza aggiunta dell'enzima antiossidante SOD-1 (Schulz et al., 2000).

2.2 La Distrofia Miotonica tipo 1

Le Distrofie Miotoniche sono malattie multisistemiche che colpiscono prevalentemente il muscolo scheletrico, e, in varia misura il muscolo cardiaco (difetti di conduzione, aritmie, cardiomiopatia dilatativa), il corpo vitreo dell'occhio (cataratta), le ghiandole sessuali (atrofia delle gonadi, sterilità), il sistema endocrino (ipotiroidismo, diabete), il muscolo liscio (disturbi gastrointestinali), il sistema nervoso centrale (ritardo intellettivo, alterazioni comportamentali), gli annessi cutanei (calvizie precoce) (Bergamasco e Mutani, 2006). Sono state caratterizzate due forme di Distrofia Miotonica: la Distrofia Miotonica tipo 1 (DM1), relativamente frequente, è definita *Distrofia di Steinert* dal medico che nel 1909 la descrisse; la seconda, rara e non totalmente definita sul piano clinico è la Miopatia Miotonica Prossimale.



Fig. 7: Fenotipo di Distrofia Miotonica tipo 1 (figura tratta da <http://www.medwave.cl/cursos/Genetica2004/Abril2005/1.act>).

La DM1 ha un'incidenza di circa 1/8000 e la prevalenza è variabile nelle diverse aree geografiche: 2-14 per 100.000 abitanti. Uno studio epidemiologico del 2001 ha evidenziato tassi di prevalenza nella Toscana nord-occidentale di 10.26 per 100.000 abitanti contro il 3.42 per 100.000 nel 1981 prima della applicazione di test genetici (Siciliano et al., 2001).

La Distrofia di Steinert è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante. Gli aspetti clinici più importanti della patologia sono la miotonia e la debolezza muscolare, oltre alle altre caratteristiche sopra citate. Il coinvolgimento della muscolatura è evidente soprattutto nei distretti distali e nei muscoli mimici, ma è coinvolta tutta la muscolatura scheletrica, con debolezza generalizzata e facile affaticabilità. Nel 1992 è stata identificata la mutazione responsabile della malattia (Andrew, Engel, 1994).

La causa genetica della DM-1 è stata riconosciuta nell'abnorme espansione di una tripletta trinucleotidica *citosa-timina-guanina* (CTG) nella regione non codificante 3' del gene codificante per una protein chinasi (la DMPK), che mappa sul braccio lungo del cromosoma 19, nel locus 13.3 (Ranum et al., 2004). Il gene codifica per la DMPK ((Myotonic Dystrophy Protein Kinase), una proteina di 629 aminoacidi che condivide regioni di omologia con la protein-chinasi adenosin monofosfato dipendente (PKA). La DMPK è una serina-treonina protein chinasi che va incontro ad autofosforilazione, ma a differenza di altre protein chinasi, non è in grado di fosforilare altre proteine di membrana (Larkin et al., 2001). La DMPK sembra fosforilare, inibendo così l'azione, una miosina fosfatasi (MYPT1), portando così ad un aumento dei livelli di miosina fosforilata; ciò incrementa la sensibilità al calcio delle cellule muscolari lisce e porta ad alterazioni nel citoscheletro delle cellule non muscolari (Llagostera et al., 2007). Vi è correlazione fra il numero di ripetizioni della tripletta CTG, la severità della malattia e la tendenza alla comparsa precoce dei sintomi. L'espansione varia nei diversi tessuti di uno

stesso individuo, e ciò spiega le diverse manifestazioni della patologia. Sulla base del numero di ripetizioni della tripletta trinucleotidica CTG i pazienti vengono suddivisi in quattro classi di espansione, come riportato nella seguente tabella:

CLASSE	N° DI RIPETIZIONI DI CTG
E1	50-500
E2	500-1000
E3	1000-1500
E4	> 1500

Tab. 2: Classi di espansione trinucleotidiche.

Negli individui normali la lunghezza delle ripetizioni trinucleotidiche è nel range tra 3-37, mentre la lunghezza delle ripetizioni nel range tra 42-150 è presente in individui senza manifestazioni cliniche di malattia o con interessamento clinico medio (Jansen et al., 1994) e ripetizioni dell'ordine di migliaia ed oltre sono tipiche di individui maggiormente compromessi o dei casi di Distrofia Miotonica congenita (Piñeiro et al., 2003).

L'esordio della malattia è tra i 18 e i 35 anni, a volte può passare inosservato, a volte un trauma, una forte emozione o una malattia intercorrente possono rendere manifesta la patologia. La manifestazione d'esordio è spesso il fenomeno miotonico. Questo consiste in una prolungata contrazione muscolare che persiste dopo la sospensione dell'attività volontaria: clinicamente si traduce in difficoltà ad aprire gli occhi dopo la chiusura forzata, a rilasciare la presa, a iniziare la deambulazione o a deglutire, per contrattura dei muscoli oro-faringei, soprattutto in seguito al contatto con sostanze fredde. Esistono altri tipi di attività miotonica causate da eccitazione

meccanica diretta del muscolo, per stimolazione elettrica o dopo somministrazione di acetilcolina, di cloruro di potassio e prostigmina.

Elettromiograficamente si tratta di una sequenza di potenziali d'azione spontanei a riposo che si scatenano con l'inserzione dell'agolettrodo a frequenza variabile. Questi potenziali d'azione aumentano inizialmente, raggiungono un valore massimo e successivamente decrescono. Il fenomeno miotonico è dunque espressione di ipereccitabilità neuromuscolare dovuta all'instabilità elettrica del sarcolemma a sua volta causata dall'alterazione della permeabilità degli ioni della membrana cellulare della fibra, soprattutto degli ioni potassio.

La consistente fuoriuscita di questi ioni causerebbe la depolarizzazione ripetitiva della membrana della fibra muscolare. Infatti il contenuto di potassio del muscolo miotonico è notevolmente diminuito, mentre la somministrazione a pazienti affetti da miotonia di sostanze come i glucocorticoidi, il glucosio e l'insulina, che favoriscono l'ingresso nella fibra muscolare del potassio, diminuiscono l'entità del fenomeno miotonico.

Nella patogenesi dell'ipereccitabilità delle fibre muscolari si ritiene coinvolta anche l'alterazione, fino alla completa perdita, della funzionalità dei canali del cloro di tipo 1, espressi specificatamente a livello delle cellule muscolari e fondamentali per la stabilità elettrica della membrana stessa; strutturalmente sono costituiti da un omodimero, ciascuno contenente un proprio poro transmembrana, e con ogni subunità formata da 18 regioni ad α -elica di lunghezza variabile (Duffield et al., 2003). Il ruolo dei canali del cloro di tipo 1 è di mantenere il potenziale di riposo delle cellule muscolari, inibendo la depolarizzazione causata dal potassio. Un'aumentata attività di alcune proteine intranucleari leganti il trascritto espanso, corrispondente alla tripletta genica ripetuta CUG (*citosa-uracile-guanina*), sarebbe responsabile dell'instabilità dei meccanismi che regolano lo "splicing" alternativo dei

trascritti mRNA con conseguente deficit di espressione delle corrispondenti proteine, tra cui il canale del cloro (Charlet et al., 2002).

Modelli di topi transgenici, esprimenti alterate triplette CUG a livello degli RNA trascritti, hanno sviluppato sia miotonia che simili alterazioni nei 12 meccanismi di splicing della proteina ClC-1, ed una riduzione della conduttanza al cloro del 70-80%, in grado di facilitare l'accumulo dello ione potassio a livello del sistema dei tubuli trasversi durante la contrazione muscolare, che innesca così la depolarizzazione cellulare ed i successivi potenziali di azione ripetitivi (Wheeler et al., 2007).

Esistono diverse forme di Distrofia di Steinert, in un nucleo familiare possono anche coesistere forme senza sintomi evidenti. La forma congenita è la più grave, con nascita prematura, grave ipotonia, difficoltà di suzione e deglutizione, deformità scheletriche e problemi respiratori che spesso possono diventare fatali. Se viene superata questa fase, in genere l'ipotonia muscolare diminuisce nel tempo e i bambini acquisiscono le tappe motorie, ma rimane grave il deficit intellettivo. Nella forma infantile i sintomi compaiono più tardi e consistono in ipotonia, debolezza della muscolatura mimica facciale e deficit cognitivo. In genere il decesso avviene per complicazioni cardiache. Nelle forme adulte si hanno gli stessi sintomi ma si manifestano in età più avanzata.

Gli interventi terapeutici consistono in terapie cardiologiche (antiaritmici, antiipertensivi, posizionamento di pacemaker o di defibrillatore intracardiaco), endocrinologiche (terapia sostitutiva tiroidea), respiratorie (ventilazione assistita) e fisiatriche (prevenzione delle retrazioni tendinee). Il fenomeno miotonico invece può migliorare utilizzando farmaci come il chinino, la difenilidantoina, oppure antiaritmici come la procainamide e la mexiletina (Bergamasco e Mutani, 2006).

Poiché nella DM-1 l'espansione della tripletta CTG è localizzata in una regione non codificante del gene DMPK, questo non codifica per una proteina con alterata funzione. Infatti, ancora ora, il meccanismo fisiopatologico alla base della patologia risulta sconosciuto.

Tra le ipotesi formulate c'è la teoria che le mutazioni interferiscano con la produzione di DMPK, infatti i livelli di mRNA e della proteina sono ridotti nei muscoli dei pazienti miotonici e topi omozigoti per la mutazione del gene DMPK sviluppano debolezza muscolare e alterazioni miopatiche (Cho et al., 2007). Tuttavia analisi knock-out per il gene DMPK hanno dimostrato che anche delezioni complete non conferiscono lo sviluppo del fenotipo della malattia (Day et al., 2005). Nuove ipotesi hanno considerato che il danno cellulare possa essere dovuto all'aumento progressivo di enormi quantità di RNA trascritti, contenenti alterate ripetizioni CUG, che formano accumuli intranucleari. Modelli di topi transgenici, con l'espressione di RNA messaggeri con circa 250 sequenze CUG ripetute, hanno sviluppato miotonia e le caratteristiche miopatiche tipiche (Cho et al., 2007).

Altre ipotesi considerano che una alterata funzione ossidativa mitocondriale possa essere alla base del meccanismo patogenetico. Queste si basano su evidenze che dimostrano come esistano alterazioni mitocondriali in pazienti DM-1, in particolare del coenzima Q (Tedeschi et al., 2000). A tale riguardo è stato dimostrato come si riscontrino effettivamente ridotte concentrazioni di coenzima Q nel sangue di questi pazienti, e di come tali livelli tendano a diminuire in modo proporzionale all'entità dell'espansione della tripletta CTG, avvalorando quindi l'ipotesi di un meccanismo implicante uno stress ossidativo precoce (Siciliano et al., 2002).

Inoltre pazienti affetti da Distrofia di Steinert presentano caratteristiche cliniche e biochimiche riscontrabili anche nelle miopatie mitocondriali, per esempio in biopsie muscolari si sono trovate alterazioni come "*ragged red*

fibers”, fibre citocromo C ossidasi negative ed anomalie ultrastrutturali dei mitocondri. Infatti pazienti sottoposti ad un protocollo di esercizio incrementale su cicloergometro hanno riportato livelli di acido lattico sierici maggiori dei controlli sani, sia a riposo sia al picco dello sforzo, suggerendo una precoce attivazione del metabolismo anaerobico nei muscoli scheletrici (Siciliano et al., 2002).

Studi “in vivo” su soggetti affetti da DM-1 hanno evidenziato livelli ematici di radicali liberi e perossidi lipidici aumentati rispetto ai controlli, cui era anche associata una riduzione delle difese antiossidanti cellulari. Da uno studio recente, condotto su 39 pazienti, si è riscontrato un aumento effettivo di alcuni parametri ematici come proteine ossidate (AOPP) e di γ -glutamilttransferasi nei pazienti affetti da DM-1, rispetto ai controlli sani; inoltre i valori sierici delle AOPP correlavano significativamente con l’impegno extramuscolare dei pazienti reclutati (Siciliano et al., 2005). Usuki et al. nel 1998 hanno postulato l’ipotesi che le ripetizioni CTG potessero influenzare la suscettibilità delle cellule allo stress ossidativo, ed inoltre hanno osservato che l’entità dell’espansione delle triplette può attivare diverse vie alternative di trasduzione del segnale a seguito dell’aumento dello stress ossidativo. Toscano et al. nel 2005 hanno evidenziato un significativo incremento dei valori di alcuni marcatori dello stress ossidativo come superossido dismutasi (SOD), malondialdeide (MAL) e acido 2,5 diidrossibenzoico (2,5-DHBA) rispetto a controlli sani, avvalorando così l’ipotesi che lo stress ossidativo possa contribuire alla progressione del danno cellulare nella DM-1 (Toscano et al., 2005).

3. SCOPO DELLA TESI

Considerando il possibile ruolo patogenetico dello stress ossidativo nella distrofia miotonica tipo 1, lo scopo della presente tesi è di valutare alcuni parametri dello stress ossidativo in soggetti affetti da questa malattia, sia in condizioni di riposo, sia dopo un esercizio muscolare eseguito dai muscoli dell'avambraccio, e di verificare come questi possano modificarsi dopo una terapia antiossidante. Questa si è basata sull'utilizzo di un integratore alimentare proteico donatore di cisteina, arricchito con superossido dismutasi 1 (SOD-1), in modo da favorire la sintesi di glutathione e la rimozione di radicali liberi. L'integratore alimentare è un concentrato di proteine non denaturate del siero del latte ad alto contenuto di cisteina.

Lo studio è stato condotto in doppio cieco cioè 12 pazienti hanno assunto il pro-farmaco per trenta giorni e 8 pazienti hanno assunto una sostanza inerte per lo stesso periodo di tempo.

Le determinazioni biochimiche ematiche eseguite sono state:

- il dosaggio dei livelli plasmatici dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP), parametro che esprime il danno ossidativo esercitato in vivo;
- il dosaggio della capacità ferro-riducente del plasma (FRAP) che permette di valutare le capacità anti-ossidanti del plasma, con la riduzione del liquido biologico dello ione ferrico, presente nel reattivo FRAP, in ione ferroso;
- il dosaggio del glutathione totale (GSH) nel sangue intero.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Soggetti in studio

Nel presente studio sono stati selezionati 20 pazienti, 13 maschi e 7 femmine di età compresa tra i 62 e i 21 anni, con diagnosi clinica e genetica di Distrofia Miotonica tipo 1 diagnosticata sulla base del quadro clinico, della storia familiare, dei dati strumentali e dell'analisi del DNA. I pazienti sono stati esaminati presso l'ambulatorio per le Malattie Muscolari della Clinica Neurologica di Pisa. I pazienti sono stati informati sulle finalità e modalità dello studio e sono stati suddivisi in due bracci di studio. Dodici pazienti, 7 maschi e 5 femmine (età media \pm deviazione standard: $49,58 \pm 11,49$), hanno assunto 10 grammi al giorno, per 30 giorni, di integratore alimentare donatore di cisterna, addizionato con superossido dismutasi 1 e gli altri 8, 6 maschi e 2 femmine (età media \pm deviazione standard: $43,75 \pm 11,31$), sono stati trattati con un farmaco placebo per lo stesso periodo di tempo. Questo ultimo gruppo di persone viene definito "gruppo di controllo", in quanto il farmaco somministrato è una sostanza inerte priva di qualsiasi effetto farmacologico, ma esteriormente indistinguibile dal farmaco vero e proprio.

La sperimentazione è stata effettuata in doppio cieco, quindi né i pazienti, né lo sperimentatore sapevano quale trattamento fosse somministrato ai trenta soggetti in studio. Solo una terza persona, non implicata direttamente nello studio, sapeva quale sottogruppo ricevesse il placebo e quale il farmaco. Tutti i soggetti in studio sono stati sottoposti, previo consenso informato, a prelievo di sangue venoso per la determinazione dei prodotti di ossidazione delle proteine (AOPP), della capacità ferro-riducente del plasma (FRAP) e del

glutathione totale su sangue intero. La valutazione dei parametri di stress ossidativo è stata ripetuta alla fine del periodo di trattamento. Le caratteristiche cliniche, l'età e il tipo di trattamento effettuato dai trenta pazienti sono riassunti nella seguente tabella:

N° paziente	Sesso	Età	Fenomeno miotonico	Deficit di forza agli arti	Classe di espansione trinucleotidica	Terapia assunta nello studio
1	♂	61	×	×	E2	Placebo
2	♂	38	×	×	E2	Integratore
3	♀	43	×	×	E1	Placebo
4	♀	60	×	×	E2	Integratore
5	♂	51	×	×	E1	Integratore
6	♀	45	×	×	E1	Placebo
7	♂	40	×	×	E1	Placebo
8	♂	56	×	×	E1	Integratore
9	♀	47	×	×	E2	Integratore
10	♂	43	×	×	E2	Placebo
11	♀	58	×	×	E1	Integratore
12	♀	62	×	×	E2	Integratore
13	♂	58	×	×	E2	Placebo
14	♂	30	×	-	E2	Placebo
15	♂	59	×	×	E2	Integratore
16	♂	45	×	×	E2	Integratore
17	♂	47	×	×	E1	Integratore
18	♂	21	×	-	E2	Integratore
19	♀	51	×	×	E2	Integratore
20	♂	30	×	×	E2	Placebo

Tab. 3: Caratteristiche cliniche pazienti.

Nella tabella 4 sono riportate le terapie domiciliari dei 20 pazienti:

N° PAZIENTE	TERAPIA DOMICILIARE
1	fibrati, esomeprazolo.
2	insulina, repaglinide.
3	ubidecarenone, vitamina E, levocarnitina.
4	ubidecarenone, ademetonina butandisolfonato, creatina, bisoprololo, sertralina.
5	nessuna terapia.
6	insulina.
7	vitamina E, levotiroxina, fenofibrato.
8	levocarnitina, ubidecarenone, vitamina E, omega polienoici.
9	carnitina.
10	nessuna terapia.
11	metformina+glibenclamide, latanoprost.
12	domperidone, pantoprazolo, magnesio, idrossido+algeldrato.
13	tiotropio bromuro, salmeterolo+fluticasone.
14	lansoprazolo.
15	triatec, warfarin, tiotropio bromuro, levotiroxina, vitamina E, aspartato di arginina, allopurinolo.
16	nessuna terapia.
17	mexiletina cloridrato, creatina, vitamina E.
18	mexiletina cloridrato.
19	creatina, cinoxacina, carnitina plus, levotiroxina.
20	mexiletina cloridrato.

Tab. 4: Terapie domiciliari dei pazienti in studio.

4.2 Terapia

I tredici pazienti selezionati sono stati sottoposti a trattamento con un concentrato di proteine isolato dal siero del latte ad alto contenuto di cisteina, arricchito di superossido dismutasi (SOD-1) e contenente anche vitamina C e vitamina E. L'integratore, per il suo contenuto di cisteina, rappresenta una fonte dietetica per la sintesi del glutathione e l'associazione con la SOD rappresenta una fonte esogena dell'enzima per le cellule. La superossido dismutasi è combinata con la gliadina, una proteina derivata dal frumento, che funge da trasportatore naturale dell'enzima, ritardandone la degradazione durante il processo digestivo (Vouldoukis et al., 2004). Ai soggetti in studio vengono somministrati 10 grammi del farmaco al giorno per un periodo di 30 giorni. L'integratore alimentare (Prother, Dietetic Metabolic Food, Milano) è un nutraceutico metabolico costituito da una polvere igroscopica contenente proteine ricche di cisteina, derivate dal siero di latte bovino, estratte in forma altamente purificata ed integre, attraverso l'uso di tecnologia di membrana. Nella seguente tabella viene riportata la sua composizione per 10 grammi di prodotto:

Valore energetico	36,9 kcal (155 kj)
Proteine g.	8,9
Carboidrati g.	0,1
Grassi g.	0,08
Calcio g.	0,06
Potassio g.	0,04
Sodio g.	0,025
Fosforo g.	0,021
Ferro mg.	0,93

Tab. 5: Composizione del farmaco antiossidante per 10 g di prodotto.

4.3 Protocollo di esercizio

Lo stress ossidativo aumenta con l'aumentare della attività muscolare e quindi per valutare l'andamento dei parametri ematici di stress ossidativo in relazione all'esercizio muscolare, i pazienti sono stati sottoposti, prima (T_0) e dopo la terapia (T_1), a un test di sforzo incrementale sui muscoli dell'avambraccio, eseguito con l'ausilio di un miometro connesso ad un "hand-grip" (Digital Multi-Myometer, MIE Medical Research Ltd., Leeds, UK). L'esercizio è stato condotto a riposo e con il paziente seduto. Nella fase di preparazione dell'esercizio i pazienti hanno dovuto compiere piccole contrazioni di apertura e chiusura della mano per circa cinque minuti, al fine di ridurre l'entità del fenomeno miotonico. Il protocollo di esercizio incrementale consisteva nell'impugnare l'hand-grip del miometro e contrarre massimamente la mano contro la resistenza offerta dallo stesso, determinando, in Newton, il livello di contrazione volontaria massimale (CVM). Sono state eseguite, da tutti i pazienti, una serie di fasi contrattili o "steps", condotte in maniera intermittente per un periodo di un minuto, con intervalli di riposo di 2 minuti tra uno "step" e l'altro. In ciascuno "step" le contrazioni intermittenti erano eseguite con frequenza di una al secondo contro la resistenza richiesta offerta dal miometro. L'esercizio iniziava con un primo "step" al 10% della CVM, un secondo "step" al 40% della CVM ed un ultimo "step" al 70% della CVM. Il paziente poteva seguire su un display luminoso il livello di forza generato in ogni contrazione. Questo tipo di esercizio è principalmente aerobico all'inizio del test e diviene progressivamente anaerobico man mano che aumenta la forza esercitata per progressivo reclutamento delle unità motorie rapide (Milner-Brown et al., 1973). I prelievi ematici venosi per la determinazione dei marcatori biochimici di stress ossidativo, oltre ad essere stati effettuati prima e dopo il

trattamento, sono stati eseguiti a livello basale (valore A), dopo il secondo “step” (valore B), dopo il terzo “step” (valore C) e dopo 15 minuti dalla fine dell’esercizio (valore D).

4.4 Dosaggi biochimici

4.4.1 *Determinazione dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP)*

La determinazione degli AOPP è una metodica che consente di stimare la quantità di proteine che hanno subito un processo di ossidazione, a livello di specifici residui amminoacidici, da parte di specie chimiche reattive.

Il sangue venoso dei 20 pazienti, prelevato a digiuno, è stato centrifugato (600 g) per 10 minuti per ottenere il plasma, il quale è stato conservato a – 20°C fino al momento delle analisi. La determinazione degli AOPP è stata eseguita in una piastra da 96 pozzetti trasparente agli UV (Greiner bio-one), con l'ausilio di un lettore di piastre (VICTOR3, Perkin Elmer), seguendo il protocollo descritto da Witko-Sarsat et al. (1996). Brevemente, a 200 µl di plasma diluiti 1:5 in tampone fosfato di Dulbecco (PBS) sono stati aggiunti 20 µl di acido acetico seguiti da 10 µl di ioduro di potassio 1,16 M. Il valore di assorbanza a 340 nm di tale miscela di reazione è stato immediatamente determinato. A quest'ultimo è stato sottratto il valore di assorbanza di un bianco costituito da 200 µl di PBS ai quali erano stati aggiunti 20 µl di acido acetico e 10 µl di ioduro di potassio 1,16 M. La curva di calibrazione è stata allestita utilizzando diluizioni scalari di una soluzione di cloramina T 0,1 mM in PSB, ed i valori di AOPP sono stati espressi come nmol/ml di equivalenti di cloramina T.

4.4.2 Determinazione della capacità ferro-riducente del plasma (FRAP)

La determinazione della FRAP è una metodica che permette di valutare la capacità anti-ossidante del plasma, mediante la riduzione, da parte dello stesso plasma, dello ione ferrico, presente nel reattivo FRAP, in ione ferroso.

Il sangue venoso dei pazienti e dei controlli, prelevato a digiuno, è stato centrifugato (600 g) per 10 minuti per ottenere il plasma, il quale è stato conservato a -20°C fino al momento del dosaggio. La determinazione della FRAP è stata eseguita in una piastra da 96 pozzetti (SARSTEDT), con l'ausilio di un lettore di piastre ELISA (Lab system Multiskan Plus MKII Lab system Milano) seguendo il protocollo descritto da Benzie e Strain (1996).

Per la preparazione del reattivo FRAP sono stati miscelati i seguenti reagenti:

- 25 ml di tampone sodio-acetato 300 mM, pH 3,6;
- 2,5 ml di tripiridiltriazina 10 mM, disciolta in acido cloridrico 40 mM;
- 2,5 ml di cloruro ferrico 20 mM, disciolto in acqua.

Il reattivo ottenuto è stato scaldato per 10 minuti a 37°C, quindi 250 µl sono stati aggiunti a 8 µl di plasma di ciascun campione. L'assorbanza della miscela di reazione è stata valutata alla lunghezza d'onda di 570 nm, quindi è stato sottratto il valore di un bianco costituito da 100 µl di acido cloridrico 10 mM, ai quali sono stati aggiunti 250 µl di reattivo FRAP. La curva di 49 calibrazione è stata allestita utilizzando una diluizione scalare di una soluzione di solfato di ferro 4 mM in acido cloridrico 10 mM. I valori della FRAP sono stati espressi in mmol/L.

4.4.3 Determinazione del glutatione totale

Il contenuto di glutatione totale su sangue intero venoso di 20 pazienti è stato determinato con il metodo di cinetica enzimatica descritto da Tietze (1969), e modificato da Baker et al. (1990), in modo tale da consentire l'utilizzo di una piastra da 96 pozzetti e quindi di un lettore di piastre ELISA (Labsystem Multiskan Plus MKII-Lab system Milano).

Sono stati aggiunti a 990 µl di acido sulfosalicilico (SSA) 1%, 10 µl di sangue venoso, prelevato a digiuno. Il campione è stato conservato per 30 minuti a 4° C, prima di essere centrifugato (10000 g per 5 minuti) per ottenere l'estratto acido, che è stato conservato a -20°C. Al momento della determinazione, a 50 µl di estratto acido, diluito 1:10 in tampone sodio fosfato 0,1 M, pH 7,5, contenente EDTA 1mM, sono stati aggiunti 100 µl di miscela di reazione costituita da

- 5,85 ml di tampone sodio fosfato;
- 3,75 ml di β-nicotinamide-adenina-dinucleotide-fosfato, (NADPH);
- 2,80 ml di 5-5'-di-tio-bis(2nitrobenzoico), (DTNB);
- 11,87 µl di GSH-reduttasi.

La reazione enzimatica è stata seguita per 3 minuti effettuando una lettura ogni 10 secondi alla lunghezza d'onda di 405 nm. Ai valori di variazione di assorbanza al minuto sono stati sottratti quelli relativi al bianco, costituito da SSA 1%. La curva di calibrazione è stata allestita utilizzando una diluizione scalare di una soluzione di GSSG 2µg/ml. I valori di glutatione sono stati normalizzati per il valore dell'ematocrito e sono stati espressi in nmoli/µl.

4.5 Analisi statistica

Per ciascun indice è stato calcolato il valore medio e la deviazione standard (media \pm DS).

Il confronto dei valori delle scale, dei parametri biochimici AOPP, FRAP e glutazione totale fra il gruppo di pazienti trattati ed il gruppo trattato ed, in entrambi i gruppi tra prima (T_0) e dopo (T_1) trattamento con la rispettiva terapia, è stato eseguito per mezzo del test t di Student. Quest'ultimo è stato utilizzato anche per confrontare i livelli di AOPP, FRAP e glutazione totale nei tre steps successivi dello sforzo muscolare e a 15 minuti di riposo, prima e dopo il trattamento, sia nel gruppo trattato con il farmaco sia nell'altro gruppo. In tutti i casi, la significatività statistica è stata considerata significativa per $p \leq 0,05$, molto significativa per $p \leq 0,01$ e altamente significativa per $p \leq 0,001$.

5. RISULTATI

I valori di AOPP, FRAP e glutathione totale sono stati determinati nel sangue dei 20 pazienti prelevato sia prima (T_0) che dopo (T_1) la terapia in condizioni di riposo (A), dopo il secondo (B) e il terzo (C) step dell'esercizio muscolare e dopo 15 minuti dalla fine dell'esercizio (D).

5.1 Prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP)

I valori medi basali delle AOPP dei 20 pazienti, in condizioni di riposo, risultano essere $185,66 \pm 133,39$ nmol/ml. In uno studio, condotto precedentemente nel nostro laboratorio, erano stati determinati i valori di AOPP in un gruppo di soggetti sani, la cui media ($143,53 \pm 44,67$ nmol/ml) non differisce statisticamente da quella dei pazienti con Distrofia Miotonica ($p > 0,05$).

Nella tabella 6 sono riportate le medie e le deviazioni standard delle AOPP dei 20 pazienti reclutati per lo studio nei quattro tempi del test di sforzo muscolare, prima della terapia:

PZ TOT AOPP	<i>MEDIA T_0</i>	<i>DS T_0</i>
A	185,66	133,39
B	218,24	168,95
C	268,25	168,30
D	146,12	126,71

Tab. 6: Medie e deviazioni standard (DS) dei valori delle AOPP di tutti i pazienti, prima della terapia, nei quattro tempi del test di sforzo muscolare.

Nella tabella 7 possiamo osservare le medie e le deviazioni standard dei pazienti che hanno assunto il farmaco e dei soggetti che hanno assunto il placebo, prima e dopo la terapia, ai tempi A, B, C e D dell'esercizio muscolare:

	AOPP nmol/ml PZ/ integratore		AOPP nmol/ml PZ/placebo	
	<i>T₀</i> <i>MEDIA ± DS</i>	<i>T₁</i> <i>MEDIA ±DS</i>	<i>T₀</i> <i>MEDIA ± DS</i>	<i>T₁</i> <i>MEDIA ±DS</i>
A	198,63 ± 147,37	77,16 ± 25,70	166,20 ± 115,97	167,69 ± 109,61
B	176,80 ± 107,11	88,87 ± 29,56	264,86 ± 217,81	199,21 ± 192,95
C	290,03 ± 171,55	195,19 ± 110,89	243,75 ± 172,67	157,58 ± 106,84
D	114,21 ± 86,12	143,48 ± 140,92	188,66 ± 166,00	157,52 ± 121,14

Tab. 7: Medie e deviazioni standard (DS) dei valori delle AOPP prima (T₀) e dopo (T₁) la terapia nei due gruppi di studio nei quattro tempi del test di sforzo muscolare.

Come mostrato nella figura 9, dopo il trattamento, nel gruppo dei pazienti che hanno utilizzato l'antiossidante, c'è una riduzione molto significativa dei valori delle AOPP al tempo A (T_0 : $198,63 \pm 147,37$ nmol/ml vs T_1 : $77,16 \pm 25,7$ nmol/ml; $p(A) < 0,01$), mentre tali valori rimangono pressochè invariati nel gruppo dei pazienti a cui è stato somministrato placebo.

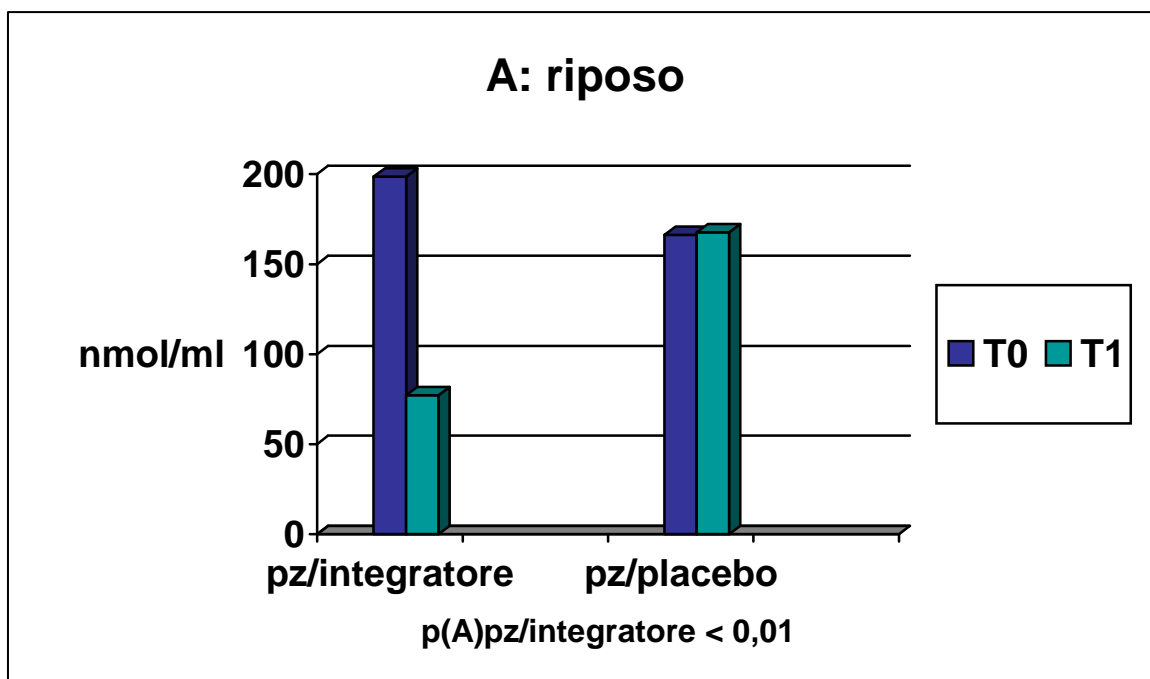


Fig. 9: Confronto AOPP pazienti/integratore e pazienti/placebo in condizioni di riposo, prima (T_0) e dopo (T_1) la terapia.

Nelle figure 10 e 11 sono rappresentati gli andamenti dei valori di AOPP nei quattro tempi dell'esercizio muscolare, prima e dopo la terapia, rispettivamente nei pazienti che hanno assunto l'integratore e in quelli che hanno assunto placebo. In figura 10 si osserva che, dopo terapia con integratore, si verifica una diminuzione significativa dei livelli delle AOPP anche al tempo B (T_0 : $176,80 \pm 107,11$ nmol/ml vs T_1 : $88,87 \pm 29,56$ nmol/ml; $p(B) < 0,05$), oltre che in condizioni di riposo. Ai tempi C e D del test di sforzo, prima e dopo il trattamento con il farmaco antiossidante, le

determinazioni delle AOPP non differiscono in maniera statisticamente significativa.

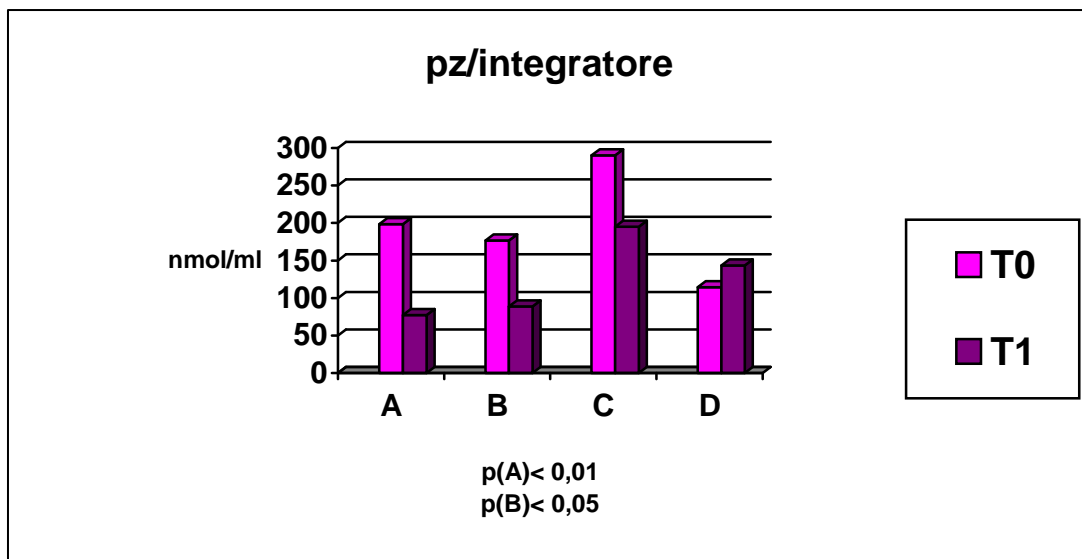


Fig. 10: Andamento AOPP pazienti/integratore durante il test incrementale, prima (T_0) e dopo terapia (T_1).

Nel gruppo di pazienti trattati con placebo, anche se c'è stato un lieve decremento, non si è verificata alcuna differenza statisticamente significativa tra i valori prima e dopo la terapia nè in condizioni di riposo, nè durante l'esercizio muscolare, nè dopo i 15 minuti dalla fine dell'esercizio (Fig. 11).

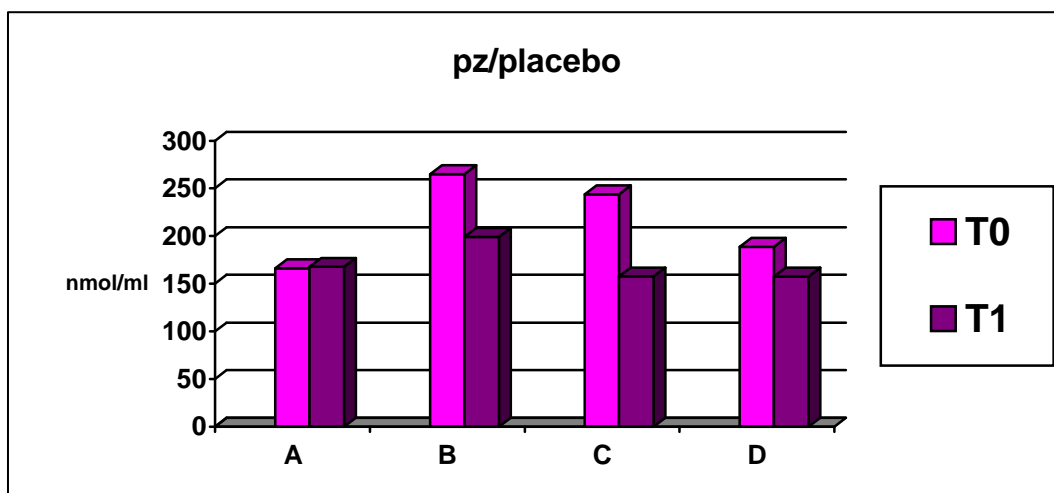


Fig. 11: Andamento AOPP pazienti /placebo durante il test incrementale, prima (T_0) e dopo 30 giorni (T_1).

5.2 Capacità ferro-riducente del plasma

La media dei valori plasmatici della capacità ferro-riducente (FRAP) riscontrata nei 20 pazienti è di $0,22 \pm 0,10$ mmol/L, questo valore differisce in maniera altamente significativa ($p < 0.001$) da quello osservato in un gruppo di soggetti sani ($0,75 \pm 0,17$ mmol/L).

Nella tabella 8 sono riportate le medie e le deviazioni standard della FRAP in tutti i 20 pazienti prima della terapia nei quattro tempi del test di sforzo muscolare:

PZ TOT FRAP	<i>MEDIA T_0</i>	<i>DS T_0</i>
A	0,22	0,10
B	0,18	0,11
C	0,19	0,15
D	0,16	0,10

Tab. 8: Medie e deviazioni standard (DS) dei valori della FRAP di tutti i pazienti, prima della terapia, nei quattro tempi del test di sforzo muscolare.

Nella tabella 9 osserviamo le medie e le rispettive deviazioni standard della FRAP dopo la terapia, ai tempi A, B, C e D del test di sforzo, nei pazienti trattati con l'antiossidante e nei pazienti trattati con il farmaco inerte:

	FRAP PZ/ integratore		FRAP PZ/placebo	
	T_0 <i>MEDIA ± DS</i>	T_1 <i>MEDIA ±DS</i>	T_0 <i>MEDIA ± DS</i>	T_1 <i>MEDIA ±DS</i>
A	0,18 ± 0,07	0,23± 0,06	0,28 ± 0,12	0,18 ± 0,07
B	0,15 ± 0,07	0,18 ± 0,04	0,22 ± 0,14	0,21 ± 0,20
C	0,13 ± 0,06	0,16 ± 0,03	0,26 ± 0,19	0,17 ± 0,15
D	0,12 ± 0,09	0,17 ± 0,06	0,20 ± 0,10	0,08 ± 0,07

Tab. 9: Medie e deviazioni standard (DS) dei valori del glutatione totale prima (T_0) e dopo (T_1) la terapia nei due gruppi di studio nei quattro tempi del test di sforzo muscolare.

Come mostrato in figura 14, dopo 30 giorni al tempo A, nei pazienti che hanno assunto l'integratore, la FRAP aumenta; tuttavia tale incremento non raggiunge la significatività statistica ($p < 0,05$). Nel gruppo dei pazienti a cui è stato somministrato placebo, in condizioni di riposo, al tempo T_1 , si osserva un decremento delle concentrazioni della FRAP ($p < 0,05$).

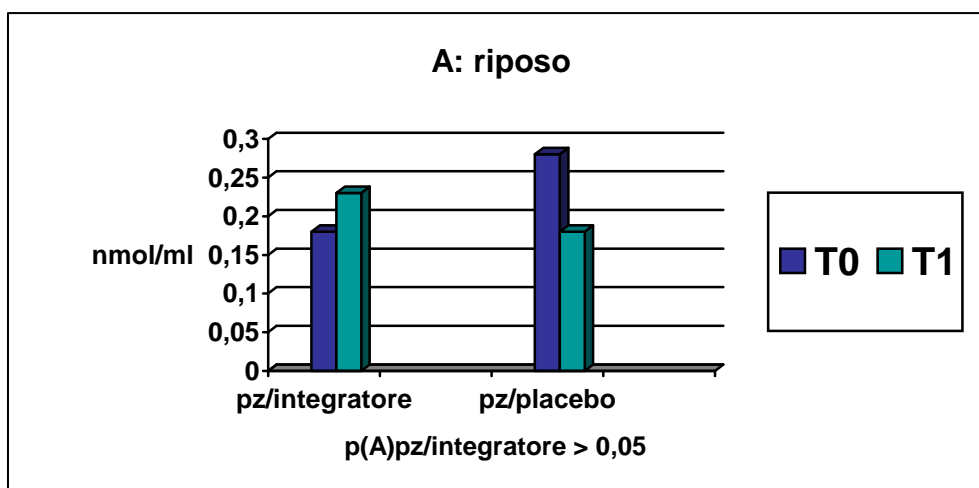


Fig. 14: Confronto FRAP pazienti/integratore e pazienti/placebo in condizioni di riposo, prima (T_0) e dopo (T_1) la terapia.

Le medie delle concentrazioni della FRAP nei pazienti trattati con antiossidante mostrano un aumento non significativo al T_1 rispetto al T_0 nei tempi A, B, C e D (Fig. 16).

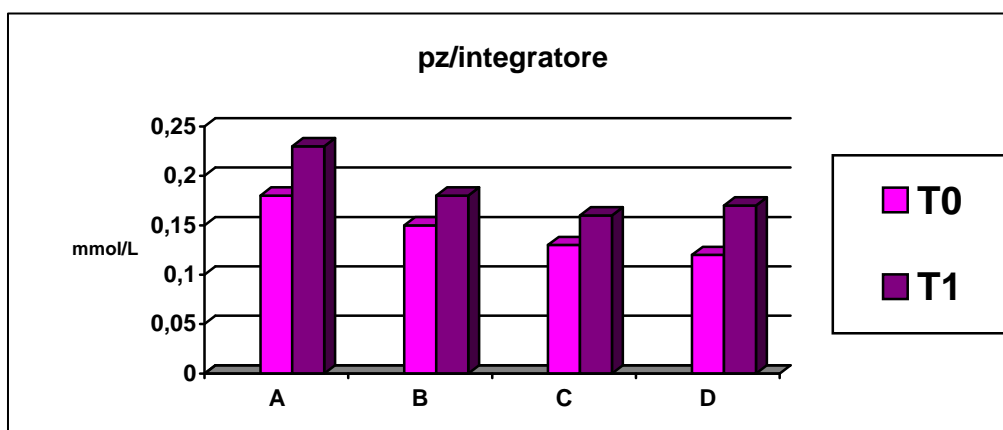


Fig. 16: Andamento FRAP pazienti/integratore durante il test incrementale, prima (T_0) e dopo terapia (T_1).

Nelle figure 15 e 16 vengono illustrati i valori della FRAP prima e dopo terapia, nei quattro tempi, rispettivamente dei pazienti trattati con l'integratore e dei pazienti trattati con placebo.

Nella figura 15 notiamo, dopo terapia al tempo A, una diminuzione significativa dei valori della FRAP nei pazienti che hanno assunto il placebo. Al tempo D invece, possiamo osservare una diminuzione altamente significativa rispetto ai valori al T_0 degli stessi soggetti (T_0A : $0,28 \pm 0,12$ mmol/L vs T_1A : $0,18 \pm 0,07$, $p(A) < 0,05$; T_0D : $0,20 \pm 0,10$ mmol/L vs T_1D : $0,08 \pm 0,07$ mmol/L, $p(D) < 0,001$).

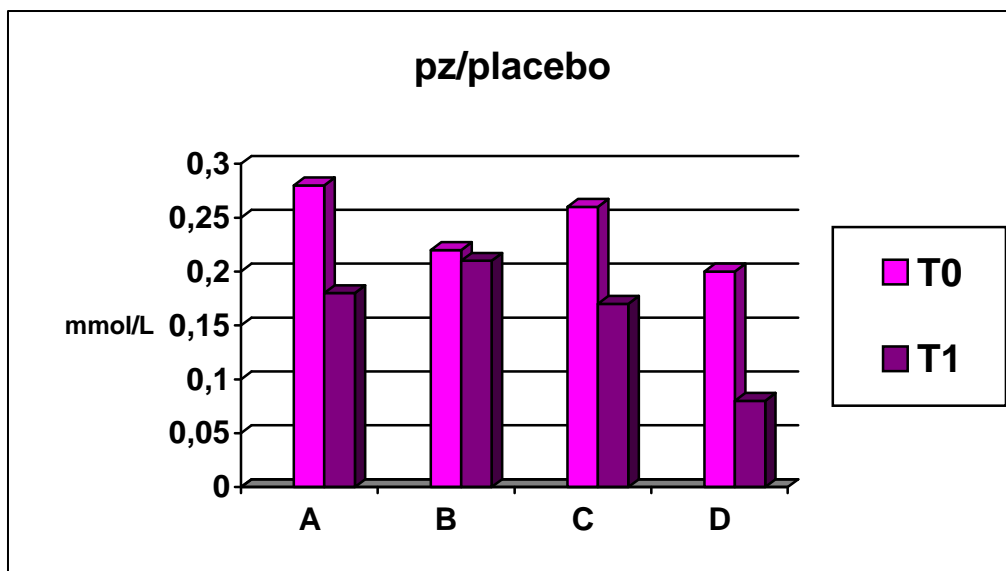


Fig. 15: Andamento FRAP pazienti/placebo durante il test incrementale, prima (T_0) e dopo terapia (T_1).

5.3 Glutazione totale

La media dei valori plasmatici del glutazione totale riscontrata nei 20 pazienti è di $1,00 \pm 0,45$ nmol/ μ l. Confrontando queste concentrazioni con i livelli di glutazione totale in un gruppo di soggetti sani ($2,28 \pm 0,22$ nmol/ μ l) possiamo notare una differenza altamente significativa ($p < 0.001$).

Nella tabella 10 possiamo osservare le medie e le deviazioni standard del glutazione totale in tutti i pazienti prima dei 30 giorni di terapia ai tempi A,B,C e D del test di sforzo muscolare:

PZ TOT Glutazione totale	<i>MEDIA T_0</i>	<i>DS T_0</i>
A	1,00	0,45
B	0,81	0,32
C	0,56	0,28
D	0,96	0,48

Tab. 10 : Le medie e deviazioni standard (DS) dei valori del glutazione totale di tutti i pazienti, prima della terapia, nei quattro tempi del test di sforzo muscolare.

Nella tabella 11 vengono riportati le medie e le deviazioni standard, prima e dopo il trattamento, rispettivamente nei pazienti che hanno assunto il farmaco e in quelli che hanno assunto il placebo:

	Glutatione totale PZ/ integratore		Glutatione totale PZ/placebo	
	<i>T₀</i> <i>MEDIA ± DS</i>	<i>T₁</i> <i>MEDIA ±DS</i>	<i>T₀</i> <i>MEDIA ± DS</i>	<i>T₁</i> <i>MEDIA ±DS</i>
A	0,80 ± 0,30	1,47 ± 0,44	1,31 ± 0,49	0,82 ± 0,27
B	0,69 ± 0,22	1,20 ± 0,56	0,94 ± 0,38	0,74 ± 0,35
C	0,52 ± 0,26	0,81 ± 0,45	0,60 ± 0,32	0,44 ± 0,19
D	0,78 ± 0,35	1,38 ± 0,54	1,16 ± 0,55	0,81 ± 0,30

Tab. 11: Medie e deviazioni standard (DS) dei valori del glutazione totale prima (T₀) e dopo (T₁) la terapia nei due gruppi di studio nei quattro tempi del test di sforzo muscolare.

Nella figura 20 viene mostrata la differenza delle concentrazioni nei due gruppi prima e dopo la terapia. Nei pazienti che hanno assunto l'integratore alimentare si nota, al T₁A rispetto al T₀A, un aumento altamente significativo dei valori del glutathione totale (T₁A: $1,47 \pm 0,44$ nmol/ μ l vs T₀A: $0,80 \pm 0,3$ nmol/ μ l; $p < 0,001$).

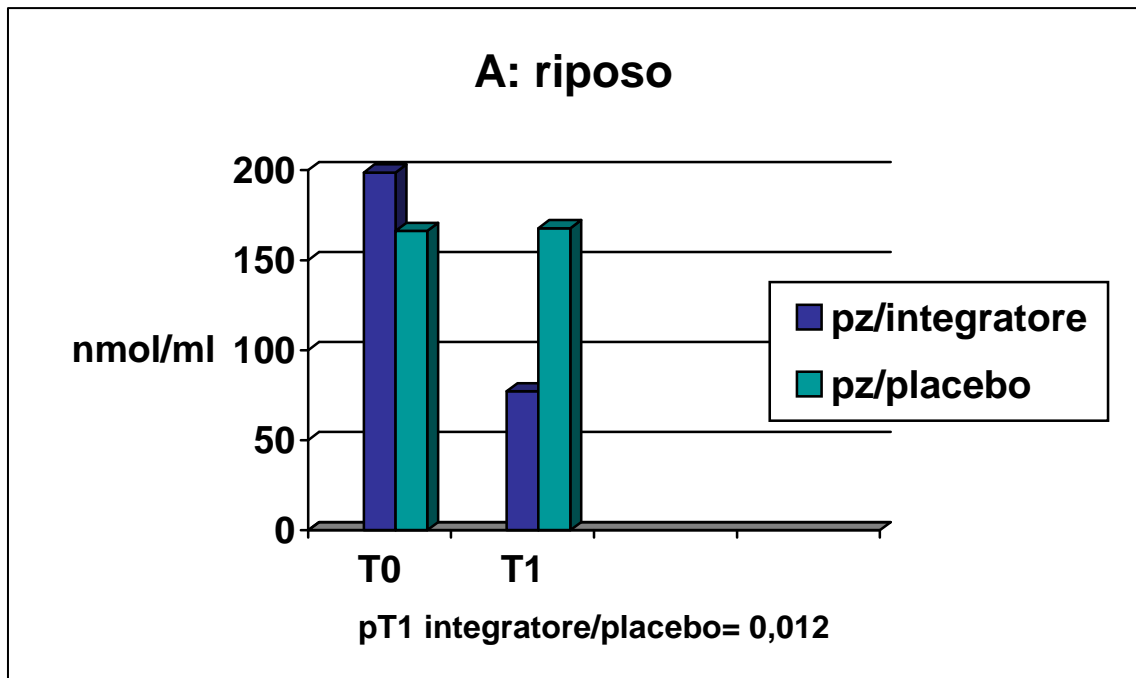


Fig. 20: Confronto glutathione totale pazienti/integratore e pazienti/placebo in condizioni di riposo, prima (T₀) e dopo (T₁) la terapia.

Come mostrato nella figura 21, dopo la terapia al tempo B, C e D, i livelli del glutathione totale nei pazienti trattati con l'antiossidante differiscono in maniera molto significativa dai valori determinati prima della terapia (T₀B: $0,68 \pm 0,22$ nmol/ μ l vs T₁B: $1,20 \pm 0,56$ nmol/ μ l; $p(B) < 0,01$. T₀C: $0,52 \pm 0,26$ nmol/ μ l vs T₁C: $0,81 \pm 0,45$ nmol/ μ l; $p(C) < 0,01$. T₀D: $0,78 \pm 0,35$ nmol/ μ l vs T₁D: $1,38 \pm 0,54$ nmol/ μ l; $p(D) < 0,01$).

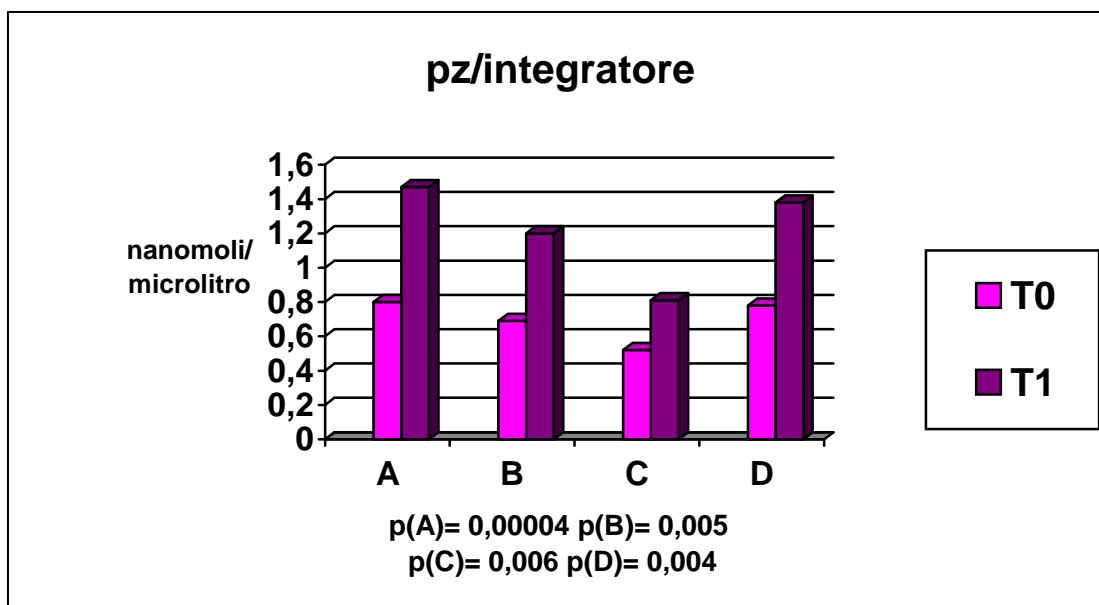


Fig. 21: Andamento glutazione totale pazienti/integratore durante il test incrementale, prima (T_0) e dopo terapia (T_1).

La determinazione dei livelli di glutazione totale nel gruppo trattato con placebo ha evidenziato, dopo i 30 giorni di trattamento, una riduzione altamente significativa dei valori del glutazione totale al tempo A ($p(A) < 0,01$) e in maniera significativa al tempo D ($p(D) < 0,05$) (fig. 22).

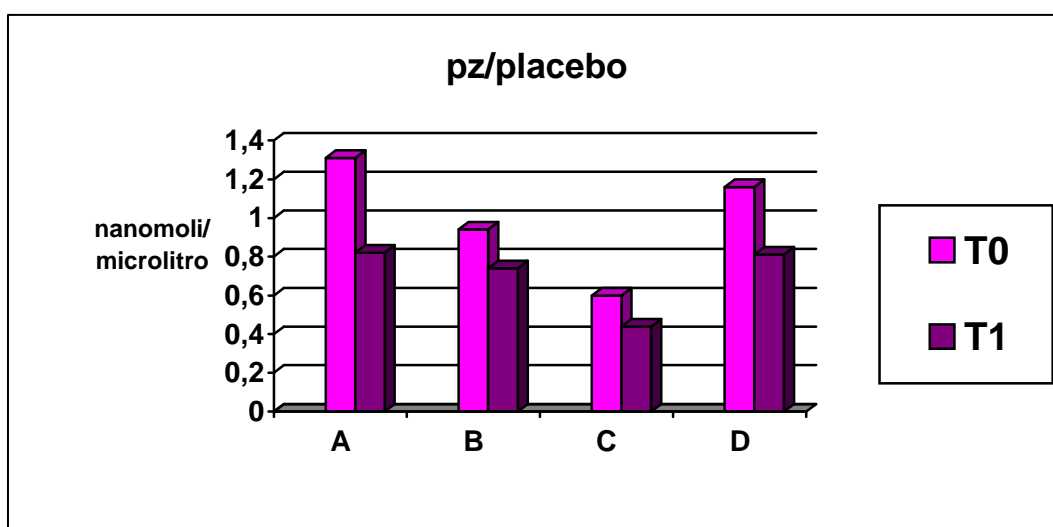


Fig. 22: Andamento glutazione totale pazienti/placebo durante il test incrementale, prima(T_0) e dopo terapia (T_1).

6. DISCUSSIONE

Lo stress ossidativo è considerato uno dei meccanismi che possono causare danno cellulare e degenerazione neuronale in diverse malattie neurologiche, tra cui le malattie neurodegenerative, le malattie mitocondriali e le distrofie miotoniche.

Numerosi dati di letteratura evidenziano un aumento dello stress ossidativo e una diminuzione delle difese antiossidanti in pazienti affetti da questo tipo di patologie. Per questa ragione negli ultimi anni è stata introdotta in terapia la somministrazione di alcune sostanze antiossidanti vitaminiche e non. Vitamina C e vitamina E sono in grado di ridurre i livelli medi dei radicali liberi dell'ossigeno e di incrementare l'azione delle difese antiossidanti. Tra le sostanze non vitaminiche vengono utilizzati i composti fenolici e polifenolici, come i flavonoidi, e il coenzima Q che sembra anche avere un effetto di stabilizzazione delle membrane cellulari.

Anche i donatori di cisteina, precursori del glutathione, vengono utilizzati in terapia per combattere lo stress ossidativo. Per la sua sintesi il glutathione necessita di una certa disponibilità di cisteina e, quindi, i composti che forniscono tale molecola dopo la loro metabolizzazione, possono aumentare la concentrazione di questo antiossidante nelle cellule.

Studi su soggetti affetti da Distrofia Miotonica tipo 1 hanno evidenziato livelli ematici di marcatori di stress ossidativo aumentati e una riduzione delle difese antiossidanti. In uno studio recente, condotto su 39 pazienti affetti da DM-1, si è riscontrato un aumento effettivo di prodotti di ossidazione delle proteine; questi valori sierici correlano significativamente con l'impegno extramuscolare dei pazienti reclutati (Siciliano et al., 2005). Altre ricerche

hanno evidenziato un aumento di valori ematici di altri marcatori di stress ossidativo, quali malondialdeide, vitamina E, radicali idrossilici come l'acido 2,5 diidrossibenzoico, superossido dismutasi (SOD) e il sistema antiossidante totale (Toscano et al., 2005).

Nel presente studio sono stati valutati alcuni parametri di stress ossidativo nel plasma di 20 pazienti affetti da DM-1, in condizioni di riposo, durante e dopo un test di sforzo muscolare, prima e dopo supplementazione orale con un farmaco placebo o con un integratore alimentare donatore di cisteina addizionato della SOD-1. Questo integratore è un concentrato di proteine del siero del latte che, grazie a una particolare procedura, viene ottenuto separandolo dagli altri componenti del latte intero come la caseina, il calcio e il fosforo legati alla caseina, i grassi e le vitamine liposolubili. Le proteine ricche in cisteina presenti nel farmaco sono la lattoferrina, l'albumina sierica e l' α -lattalbumina. Al concentrato di proteine è addizionato l'enzima antiossidante SOD-1 combinato con la gliadina, una proteina derivata dal frumento, necessaria per il trasporto naturale dell'enzima in quanto ne ritarda la degradazione durante il processo digestivo (Vouldoukis et al., 2004).

Lo studio è stato effettuato in doppio cieco. 12 pazienti sono stati trattati con il farmaco antiossidante e 8 hanno assunto un farmaco placebo indistinguibile dal farmaco vero.

I parametri valutati, in relazione alle sostanze antiossidanti, sono rappresentati dal glutatione totale e dalla capacità ferro-riducente del plasma (FRAP). Per quanto riguarda le sostanze pro-ossidanti, sono stati valutati il prodotto di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP).

Le AOPP consistono in un insieme di proteine tra cui la tiroglobulina, la γ -globulina, l'albumina e la mioglobulina (Witko-Sarsat et al., 1996).

L'elettroforesi delle proteine mostra che il picco di AOPP ad alto peso molecolare è prevalentemente dovuto all'albumina che appare sotto forma di

aggregati che probabilmente derivano da ponti disolfuro e/o da "cross-linking" della tirosina; al contrario il picco di AOPP a basso peso molecolare contiene albumina nella sua forma monomerica (Witko-Sarsat et al., 1996). In "vivo" i livelli plasmatici di AOPP correlano con i livelli di dimeri di tirosina, un marcatore di danno ossidativo delle proteine, e con la pentossidina, un prodotto di glicosilazione strettamente associato al danno ossidativo delle proteine (Selmeç et al., 2005).

La media dei valori delle AOPP determinata in tutti i pazienti prima della terapia risulta più elevata di quella relativa allo stesso parametro nel sangue di soggetti sani. Tuttavia tale differenza non raggiunge la significatività statistica e ciò potrebbe essere causato dall'effetto di altre sostanze antiossidanti presenti nella terapia domiciliare di alcuni pazienti reclutati nello studio.

Lo stress ossidativo aumenta con l'aumentare della attività muscolare. È infatti possibile osservare che i valori delle AOPP in tutti i pazienti reclutati risultano essere più bassi nei tempi B e C del test di sforzo incrementale rispetto ai tempi A e D di riposo.

I livelli ematici delle AOPP, per il gruppo sottoposto a trattamento con il farmaco antiossidante si riducono, dopo terapia, in maniera significativa, sia in condizioni di riposo, sia durante il protocollo di esercizio muscolare. Notiamo una diminuzione molto significativa di questi parametri ai tempi A e B nei pazienti che hanno assunto l'integratore, una diminuzione non significativa al tempo C e nessun aumento o diminuzione al tempo D.

I livelli di AOPP del gruppo che ha assunto il placebo, invece, dopo i 30 giorni, rimangono invariati al tempo A e hanno una riduzione non significativa ai tempi B, C e D.

Questi dati ci permettono di ipotizzare che, dopo i 30 giorni di terapia con integratore alimentare, venga generato un minor danno ossidativo sia in condizioni di riposo, sia durante l'attività muscolare aerobica.

La diminuzione statisticamente significativa di questo parametro nel gruppo di pazienti a cui è stato somministrato il farmaco sarà ulteriormente analizzata in un successivo studio dove verranno determinati gli stessi marcatori di stress ossidativo dopo 30 giorni dalla fine della terapia. In questo modo sarà possibile osservare la variazione di questi parametri dopo la sospensione della terapia e la durata nel tempo dell'azione del farmaco.

Prima del trattamento i valori dei parametri rappresentanti la capacità antiossidante del plasma (glutazione totale e FRAP), risultano minori dei valori di riferimento in tutti i pazienti reclutati, avvalorando la tesi dell'implicazione dello stress ossidativo nella patologia.

Al valore della FRAP contribuiscono, per circa il 60% l'acido urico, per il 15% l'acido ascorbico, per il 5% l' α -tocoferolo, per il 10% le proteine e per il 5% la bilirubina (Benzie et al., 1996). La metodica che permette di determinare questo parametro sfrutta la capacità di questi antiossidanti di ridurre il ferro, - sotto forma di ione ferrico presente nel reattivo FRAP, - a ione ferroso.

L'integratore alimentare utilizzato contiene anche piccole quantità di vitamina C, importante antiossidante che contribuisce ad aumentare la capacità ferro-riducente del plasma.

Dopo la terapia nei soggetti che hanno assunto il donatore di cisteina, sia in condizioni di riposo, sia durante l'esercizio fisico, si nota un aumento della FRAP che però non raggiunge la significatività. Al contrario, nei soggetti trattati con il farmaco inerte, si osserva una riduzione inspiegata di tale parametro, soprattutto al tempo D, anche se verosimilmente connessa a un ridotto recupero per effetto di una prestazione motoria relativa maggiore rispetto al gruppo che ha assunto l'integratore.

La principale funzione del glutathione è quella di operare come antiossidante proteggendo le cellule dall'azione di specie proossidanti (Dringer et al., 2000).

Le proprietà antiossidanti del glutathione sono dovute alla presenza del gruppo sulfidrilico della cisteina che gli permette di interagire sia con specie reattive dell'ossigeno, sia con altre sostanze elettrofile nell'ambito di numerosi sistemi antiossidanti e non (Pompella et al., 2003). Il glutathione allo stato ridotto (GSH) espleta la sua funzione riducendo i radicali liberi e convertendosi in glutathione ossidato (GSSG), composto da due molecole di glutathione unite da un ponte disolfuro.

In questo senso, il GSH interviene nel metabolismo dell'acqua ossigenata, degli idroperossidi e di altri perossidi organici, è capace di inattivare il radicale idrossile, radicali perossilici, il perossinitrito, l'acido ipocloroso, radicali alcossilici e l'ossigeno singoletto. Può anche ripristinare la forma ridotta di altri antiossidanti come la vitamina E e la vitamina C.

Il glutathione totale determinato al T₁, nei 4 step dell'esercizio muscolare, nei pazienti a cui è stato somministrato il farmaco risulta aumentato in maniera significativa rispetto a quello osservato all'inizio della terapia, in tutti i tempi del test di sforzo incrementale, soprattutto in condizioni di riposo. Nel sangue degli altri 8 pazienti notiamo una diminuzione di questo parametro, significativa solo al tempo A. L'andamento del glutathione totale durante lo sforzo dimostra una progressiva riduzione del parametro, che raggiunge i valori più bassi dopo il terzo step dell'esercizio muscolare, per poi ristabilirsi sui livelli iniziali, in entrambi i gruppi.

La determinazione di questo parametro, dopo la terapia, ci permette di confermare l'ipotesi del potenziale effetto favorevole sui livelli di glutathione dell'integratore donatore di cisteina. Per poter dimostrare che l'aumento del glutathione totale nei pazienti che hanno assunto l'integratore sia dovuto all'aumento del glutathione ridotto verranno effettuati ulteriori studi con l'utilizzo di differenti metodiche.

I risultati di questo studio evidenziano l'effetto protettivo della terapia antiossidante sui parametri biochimici valutati, sostenendo la tesi di un effettivo ruolo dello stress ossidativo come bersaglio di malattia o come meccanismo patogenetico di danno cellulare nella Distrofia Miotonica tipo 1. I livelli delle proteine ossidate - che sono diminuiti nel gruppo trattato dopo la terapia – e soprattutto il glutathione totale - che ha evidenziato un netto incremento dopo trattamento antiossidante - sono risultati i parametri statisticamente significativi . La modifica di tali parametri è stata confermata anche in relazione al placebo, sia a riposo sia, in alcuni, durante l'esercizio fisico.

7. CONCLUSIONI

In conclusione, i dati ottenuti con la presente tesi hanno confermato l'esistenza, nei soggetti con DM-1, di un'alterazione dell'equilibrio tra i sistemi proossidanti ed antiossidanti, con prevalenza dei primi sui secondi.

La supplementazione orale con il donatore di cisteina addizionato con SOD-1 ha modificato alcuni parametri di stress ossidativo considerati, anche in maniera significativa rispetto al periodo precedente alla terapia. Alcuni di questi parametri si sono modificati durante l'esecuzione dell'esercizio muscolare.

I parametri più significativi sono risultati i livelli delle proteine ossidate e il glutatione totale. Questi dati hanno evidenziato l'effetto della terapia antiossidante sui parametri biochimici valutati, avvalorando l'ipotesi di un effettivo coinvolgimento dello stress ossidativo nella DM-1. Quanto questi cambiamenti di marcatori biochimici siano da considerarsi significativi nel rilevare un miglioramento nella storia naturale della malattia deve ancora essere esplorato con studi a lungo termine e su gruppi più consistenti di pazienti.

8. BIBLIOGRAFIA

Andrew G., Engel M.D. *Myology: Basic and Clinical*. McGraw-Hill Professional Publishing. 1994.

Baker M.A., Cerniglia G.J., Zaman A. *Microtiter plate for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples*. Anal Biochem. 1990; 190(2): 360-365.

Beal M.F. *Oxidatively modified proteins in aging and disease*. Free Radic Biol Med. 2002; 32(9): 797-803.

Benzie I.F., Strain J.J. *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay*. Anal Biochem. 1996; 239(1): 70-76.

Bergamini L., Bergamasco B., Mutani R. *La neurologia*. Edizioni libreria cortina Torino. 2006

Charlet B.N., Savkur R.S., Singh G., Philips A.V., Grice E.A., Cooper T.A. *Loss of the Muscle-Specific Chloride Channel in Type 1 Myotonic Dystrophy Due to Misregulated Alternative Splicing*. Molecular Cell. 2002; 10: 45-53.

Cho D.H., Tapscott S.J. *Myotonic Dystrophy: Emerging mechanisms for DM1 and DM2*. Biochimica et Biophysica Acta. 2007; 1772(2): 195-204.

Comhair S.A., Erzurum S.C. *Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002; 283(2): 246-55.

Coppedè F., Mancuso M., Siciliano G., Migliore L., Murri L. *Genes and Environment in Neurodegeneration*. Biosci Rep. 2006; 26: 341-367.

Day J.W., Ranum L.P. *RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies*. Neuromuscular Disorder. 2005; 15: 5-16.

Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation*. Biochem. 1997; 15.

Dellatre J. *From molecular oxygen to oxidative stress and radical biochemistry*. Ann Pharm Fr. 2006; 64(6): 363.

Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J. *Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. Eur J Biochem. 2000; 247(16): 4912-4916.

Duffield M., Rychkov G., Bretag A., Roberts M. *Involvement of Helices at the Dimer Interface in ClC-1 Common Gating*. Journal of General Physiology. 2003; 121(2): 149-161.

Evans P.H. *Free radicals in brain metabolism and pathology*. Br Med Bull. 1993; 49(3):577-87.

Gardès-Albert M. *Physico-chemical aspects of reactive oxygen species*. Ann Pharm Fr. 2006; 64(6):365-72.

Govoni S., Pelosi C., Racchi M. *Stress ossidativo, demenza e invecchiamento: i confini incerti di un continuum biologico di difficile valutazione*. 2001.

Larkin K., Fardaei M. *Myotonic Dystrophy-A multigene disorder*. Brain Research Bulletin. 2001; 56: 389-395.

Linseman D.A. *Targeting Oxidative Stress for Neuroprotection*. Antioxid Redox Signal. 2008..

Halliwel B., Chirico S. *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr. 1993; 57(5 Suppl):715S-724S.

Ignarro L.J. *Nitric oxide a unique endogenous signaling molecule in vascular biology*. Bioscience Reports 1999; 19(2): 52-71.

Iorio E. L. *Specie chimiche reattive e radicali liberi*. convegno “Radicali liberi e antiossidanti in medicina nello sport” 2006.

Llagostera E., Catalau. *Role of Myotonic Dystrophy Protein Kinase (DMPK) I in glucose homeostasis and muscle Insulin Action*. PLoS ONE. 2007; 2(11): 1134.

Halliwel B., Gutteridge J.M.C. *Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts*. Arch Biochem Biophys. 1986; 246: 501-514.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C.. *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. Meth Enzymol. 1990; 186: 1-85.

Halliwell B., Hu M.L., Louie S., Duvall T.R., Tarkington B.K., Motchnik P., Cross C.E. *Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. Antioxidant depletion and oxidative damage*. FEBS Lett. 1992; 313(1): 62-6.

Iorio E.L., Carratelli M., D'Amicantonio T. *Stress ossidativo e malattia*. Adi magazine, 2006; 4: 399-404.

Jansen G., Willems P., Coerwinkel M., Willy Nillesen W., Smeets H., Vits L., H \ddot{u} weler C., Brunner H., Wieringa B. *Gonosomal Mosaicism in Myotonic Dystrophy Patient. Involvement of Mitotic. Events in (CTG) n Repeat Variation and Selection against extreme Expansion in Sperm*. Am. J. Hum. Genet. 1994; 54: 575-585.

Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. *Principi di Neuroscienze*. CEA. 2001.

Karlsson J. *Antioxidants and exercise*. Human Kinetics. 1997.

Kleinveld H.A., Swaak A.J., Hack C.E., Koster J.F. *Interactions between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview*. Scand J Rheumatol. 1989; 18(6):341-52.

Loft S., Poulsen H.E. *Cancer risk and oxidative DNA damage in man*. J Mol Med. 1996; 74: 297-312.

Malatesta L, Cenini S. *Principi di Chimica Generale*. Editrice Scientifica Guadagni. 1986.

Mancuso M., Coppede F., Migliore L. et al. *Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration*. J Alzheimers Dis. 2005; 10: 59-73.

Marklund S., Westman N.G., Lundgren E., Roos G. *Copper and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues*. Cancer Res. 1982; 42: 1955-1961.

Maxwell S.J.R. *Prospect for the use of antioxidant therapies*. Drugs. 1995. 49: 345-361.

Milner-Brown, Stein N.B. Yemm R. *The orderly recruitment of human motor units during voluntary isometric contraction*. J Physiol. 1973; 230(2): 59-370.

Muth C.M., Glenz Y., Klaus M., Radermacher P., Speit G., Leverage X. *Influence of an orally effective SOD on hyperbaric oxygenrelated cell damage*. Free Radical Research. 2004;38(9): 927-932.

Paolicchi A., Dominici S., Pieri L., Maellaro E., Pompella A. *Glutathione catabolism as a signaling mechanism*. Biochem Pharmacol. 2002; 64(5-6): 1027-35.

Piñeiro E., Fernández-López L., Gamez J., Marcos R., Surrallés J., Velázquez A. *Mutagenic stress modulates the dynamics of CTG repeat instability*

associated with myotonic dystrophy type 1. Nucleic Acids Research. 2003; 31(23): 6733-6740.

Poli G. *Metabolismo cellulare e produzione di radicali liberi.* In Bompiani GD, Galluzzo A. *Radicali liberi in fisiologia e patologia.* Edizioni Minerva Medica, Torino. 1990.

Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A.F. *The changing faces of glutathione, a cellular protagonist.* Biochem Pharmacol. 2003; 66(8): 1499-503.

Pryor W.A. *Free radical reactions and their importance in biochemical systems.* Fed Proc. 1973; 32: 1862-1869.

Ranum L.P.W., Day J.W. *Myotonic Dystrophy: Rna Pathogenesis Come into Focus.* Am. J. Hum. Genet. 2004; 74: 793-804.

Reiter R.J. *Oxidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin.* Neuroendocrinol Letters. 1999; 20: 145-150.

Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J., Dichgans J. *Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration.* Eur. J. Biochem. 2000; 267: 4904-4911.

Selmeci L., Seres L., Antal M., Lukacs J., Mérei A.R., Acsády G. *Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple , fast and inexpensive automated technique* Clin. Chem. Lab. Med. 2005; 43(3): 294-297.

Shibata N., Kobayashi M. *The role for oxidative stress in neurodegenerative disease Brain Nerve*. 2008;60(2): 157-70.

Siciliano G., D'Avino C., Del Corona A., Barsacchi R., Kusmic C, Rocchi A., Pastorini E., Murri L. *Impaired oxidative metabolism and lipid peroxidation in exercising muscle from ALS patients*. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2002; 3: 57-62.

Siciliano G., Manca M.L., Gennarelli M., Angelini C., Rocchi A., Iudice A., Miorin M., Mostacciuolo M.L. *Epidemiology of Myotonic Dystrophy in Italy: re-appraisal after genetic diagnosis*. Clinical Genetics. 2001; 59: 344-349.

Siciliano G., Mancuso M., Tedeschi D., Manca M.L., Renna M.R., Lombardi V., Rocchi A., Martelli F., Murri L. *Coenzyme Q10 ,exercise lactate and CTG trinucleotide expansion in myotonic dystrophy*. Brain Research Bulletin. 2001; 56: 405-410.

Siciliano G., Pasquali L., Rocchi A., Falorni M., Galluzzi F., Rocco A., Malvaldi G, Pompella A., Paolicchi A. *Advanced oxidation protein 106 products in serum of patients with myotonic disease type I: association with serum gamma-glutamyltransferase and disease severity*. Clin Chem Lab Med.. 2005; 43(7): 745-7.

Splittergerber A.G., Tappel A.L. *Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metals ions*. Arch Biochem Biophys. 1979; 197: 534-542.

Swanson J.E., Parker R.S. *Biological effects of carotenoids in humans*. In: Cadenas E, Packer L. Handbook of antioxidants. Marcel Dekker, New York. 1996.

Tannini M. *Radicali liberi: aspetti generali*. In Bompiani GD, Galluzzo A. Radicali liberi in fisiologia e patologia. Edizioni Minerva Medica, Torino. 1990.

Tedeschi D., Lombardi V., Mancuso M., Martelli F., Sighieri C., Rocchi A., Tovani S., Siciliano G., Murri L. *Potential involvement of ubiquinone in myotonic dystrophy pathophysiology: new diagnostic approaches for new rationale therapeutics*. Neurological Science. 2000; 21: 979-980.

Tietze F. *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissue*. Anal Biochem. 1969; 27(3): 502-522.

Toscano A., Messina S., Campo G.M., Di Leo R., Musumeci O., Rodolico C., Aguenouz M., Annesi G., Messina C., Vita G. *Oxidative stress in myotonic dystrophy type 1*. Free Radical Research. 2005; 39: 771-776.

Usuki F., Ishiura S. *Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increase susceptibility to oxidative stress*. Neuroreport. 1998 ;13;9(10): 2291-6.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1): 44-84.

Yan L.J. Sohal RS. *Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 27;95(22): 12896-901.

Wheeler T.M., Lueck J.D., Swanson M.S., Dirksen R.T., Thornton C.A. *Correction of ClC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy*. The Journal of Clinical Investigation. 2007; 117(12): 3952-3957.

Wink D.A., Hanbauer I., Krishna M.C., DeGraff W., Samson J., Mitchell J.B. *Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species*. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 9813-9817.

Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillere-Blandin C. et al. *Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia*. Kidney Int. 1996; 49(5): 1304- 1313.

Vouldoukis I., Conti M., Krauss P., Kamatè C., Blazquez S., Tefi M., Mazier D., Calenda A., Dugas B. *Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress*. Phytother Res. 2004; 18(12): 957-62

Zaidi S.M., Al-Qirim T.M., Banu N. *Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver.* Drugs R D. 2005; 6(3): 157-65.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare sinceramente e profondamente tutti coloro che mi hanno aiutato a raggiungere questo traguardo.

Ringrazio il Professor Gabriele Siciliano per aver reso possibile la realizzazione di questa tesi e per la disponibilità dimostrata nei miei confronti.

Ringrazio tutte le persone che lavorano nel laboratorio “Liquor”, grazie alle quali ho vissuto una piacevolissima esperienza. Grazie soprattutto alla Dott.ssa Annalisa Lo Gerfo che mi ha sempre sostenuto e guidato. Grazie mille alla Dott.ssa Petrozzi, la Dott.ssa Nesti la Sig. Baroni, il Sig. Bacci, Francesca, Teodora, Rosanna e Luca.

Un grazie particolare va ai miei genitori per tutto quello che hanno fatto e fanno per me.

Grazie a mio fratello Saverio che mi ha aiutato nei miei primi anni a Pisa e che è sempre presente nel momento del bisogno.

Inoltre vorrei approfittare di queste pagine per ringraziare le persone che ho conosciuto a Pisa e/o sono state importantissime per me in questi anni.

Per prima Valeria, mia compagna di avventure e disavventure, mia amica, confidente, con cui ho condiviso mille momenti di risate, di divertimento, di allegria, di studio, di ansie, di tristezze, di sorprese e chi più ne ha più ne metta.

Grazie a Mariella che con la sua semplicità e la sua dolcezza è sempre unica e speciale.

Grazie a “ma petite” Mira per cui provo un profondo affetto e perché è sempre un piacere stare con lei e un dispiace allontanarsene.

Grazie a Rosina, fidata amica e collega, che fa il tiramisù più buono che abbia mai mangiato ;-)

Grazie a tutte le mie coinquiline perché anche loro mi hanno donato qualcosa che porterò sempre con me in particolare Monica, Francesca, Franca, Serena, Selene e soprattutto grazie alla mitica Sofia, con cui vivo da Gennaio ma che mi ha fatto scoprire che è ancora possibile conoscere persone belle e interessanti di cui potersi fidare.

Grazie anche al mio ex-ragazzo con cui ho vissuto 2 anni a Pisa e che, anche se “ex”, per me è sempre un presente splendido ricordo.

Grazie a Franky, Valerio, Gecko, Sante, Adriano, Gennaro, C., Sara, Elisa, gli indimenticabili Pisciarino, Enrico, Simona, Mariangela, Lisa, compagni di cene, feste e risate.

Grazie mille a Giovanni che accorre sempre se ho bisogno di aiuto e che lo fa col cuore.

Grazie ai miei amici e amiche di Monopoli a cui sono profondamente legata e che mi sono sempre fedeli: Paolo, Marilina, Laura Ruggiero, Laura Barnaba, Umberto, Floriana...

Grazie ai miei compagni di studio Paolo Scappatura e Laura Lombardi che stimo e con cui ho affrontato tanti esami con entusiasmo e voglia di fare.

Grazie all'università di Pisa che mi ha dato l'opportunità di frequentare questo interessantissimo corso di studi di Neurobiologia e che mi ha permesso di vivere la mitica esperienza dell' Erasmus e per questo grazie a Carla che è stata per me una preziosa collega spagnola all'università Autonoma di Barcellona. Grazie a Laura McNeil, a Giovanni Baldinu e ad August, amici che mi hanno sempre saputo consigliare al meglio e con cui ho vissuto tanti bei momenti.

Grazie anche a tutti i professori della facoltà che ho incontrato sulla mia strada e che ricorderò sempre perché da tutti ho imparato qualcosa.

E visto che sono in vena di ringraziamenti...ringrazio anche la città di Pisa che mi ha ospitato, che ho imparato a conoscere e ad apprezzare, e che sicuramente ricorderò con nostalgia...